

Immunologische Effekte einer sublingualen Immuntherapie bei Milbenallergikern

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades
doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt dem Rat der Medizinischen Fakultät
der Friedrich- Schiller- Universität Jena

von Franziska Debevc
geboren am 19.02.1981 in Bad Salzungen

Gutachter :

- 1.
- 2.
- 3.

Tag der öffentlichen Verteidigung:

INHALTSVERZEICHNIS

1 EINLEITUNG	6
1.1 Epidemiologie allergischer Erkrankungen	6
1.2 Terminologie	8
1.3 Allergene	8
1.4 Pathogenese	10
1.5 Diagnostik	12
1.6 Therapie	14
1.6.1 Prävention	14
1.6.2 Pharmakotherapie	15
1.6.2.1 Kortikosteroide	15
1.6.2.2 H1- Antihistaminika	16
1.6.2.3 Cromone	17
1.6.2.4 Sympathomimetika	17
1.6.2.5 Leukotrienrezeptorantagonisten	18
1.6.2.6 Anticholinergika	18
1.6.2.7 Methylxanthine	18
1.6.2.8 Immunsuppressiva	19
1.6.2.9 Anti- IgE- Antikörper	19
1.6.3 Spezifische Immuntherapie	20
2 ZIELE DER ARBEIT	23
2.1 Arbeitshypothesen	23
3 MATERIAL UND METHODEN	24
3.1 Patientengut und Blutprobengewinnung	24
3.2 Probenbearbeitung	25
3.2.1 Lymphozytenseparation	25
3.3 Ansätze zur FACS- Messung	26
3.3.1 Ermittlung der verwendeten Allergenkonzentration	27
3.3.2 Bedeutung der untersuchten Antigene	28
3.3.3 FACS- Messung	30
3.4 Elispot	31
3.4.1 Prinzip	31
3.4.2 Patienten	32
3.4.3 Bedeutung der untersuchten Zytokine	33
3.4.4 Durchführung	33
3.5 Statistik	35
3.6 Durchführung einer sublingualen Immuntherapie	36

4.1 Der Einfluss der Allergenkonzentration auf die Expression von CD25 und CD69 durch T- und B- Zellen	39
4.2 Die Induktion verschiedener Oberflächenmarker und Immunglobuline von unbehandelten Milbenallergikern	40
4.2.1 Vergleich von CD71, CD69, CD54 und CD154 in der T- Zellreihe	40
4.2.2 Vergleich von CD71, CD69 sowie CD40 in der B- Zellreihe	42
4.2.3 Vergleich der Immunglobuline A, M und G in der B- Zellreihe	43
4.3 Der Vergleich verschiedener Oberflächenmarker und Immunglobuline bei Milbenallergikern unter einer sublingualen Immuntherapie	45
4.3.1 Vergleich von CD71, CD69, CD54 und CD154 in der T- Zellreihe	45
4.3.2 Vergleich von CD71, CD69 sowie CD40 in der B- Zellreihe	47
4.3.3 Vergleich der Immunglobuline A und G in der B- Zellreihe	48
4.4 Der Vergleich verschiedener Oberflächenmarker und Immunglobuline gesunder Probanden unter Allergenstimulation	49
4.4.1.1 Vergleich von CD71, CD69, CD54 und CD154 nativer und stimulierter Zellkulturen in der T- Zellreihe	50
4.4.1.2 Vergleich von CD71, CD69, CD54 sowie CD154 nach Stimulation mit unterschiedlichen Allergenen in der T- Zellreihe	51
4.4.2.1 Vergleich von CD71, CD69 und CD40 nativer und stimulierter Zellkulturen in der B- Zellreihe	52
4.4.2.2 Vergleich von CD71, CD69 und CD40 in der B- Zellreihe (stimulierte Zellkulturen)	53
4.4.3.1 Vergleich der Immunglobuline A, M und G nativer und stimulierter Zellkulturen der B- Zellreihe	54
4.4.3.2 Vergleich der Immunglobuline A, M und G in mit unterschiedlichen Allergenen stimulierten Zellkulturen der B- Zellreihe	55
4.5 Der Vergleich verschiedener Oberflächenmarker und Immunglobuline unstimulierter Lymphozyten von Milbenallergikern vor und unter einer SLIT sowie Gesunden	56
4.5.1 Vergleich von CD71, CD69, CD54 sowie CD154 durch T- Zellen unstimulierter Zellkulturen	57
4.5.2 Vergleich von CD71, CD69 und CD40 durch B- Zellen unstimulierter Zellkulturen	58
4.5.3 Vergleich von Immunglobulin A, M und G durch B- Zellen unstimulierter Zellkulturen	59
4.6 Vergleich der Expression von CD- Antigenen und Immunglobulinen	

bei Milbenallergikern vor und unter SLIT sowie gesunden Probanden	
unter Milbenallergenstimulation	60
4.6.1 Vergleich von CD71, CD69, CD54 sowie CD154 in der T- Zellreihe	61
4.6.2 Vergleich von CD71, CD69 sowie CD40 durch B- Zellen	62
4.6.3 Vergleich IgA, IgM und IgG durch B- Zellen	63
4.7 Vergleich der Differenzen aus nativer Zellkultur zum Milbenallergen-	
ansatz	65
4.7.1 Vergleich der Milbenallergiker vor und unter SLIT	65
4.7.2 Vergleich der Milbenallergiker vor einer SLIT und gesunden Probanden	65
4.7.3 Vergleich der Milbenallergiker unter SLIT und gesunden Probanden	66
4.8 Vergleich IFN- gamma, IL-4, IL- 10 und IL- 13 bei Wespengiftallergikern vor und unter subkutaner Immuntherapie sowie Gesunden	67
4.9 Zusammenfassung der wichtigsten Ergebnisse	67
5 DISKUSSION	68
5.1 Oberflächenmoleküle und membrangebundene Immunglobuline auf B- und T- Zellen von Milbenallergikern vor und unter einer sublingualen Immuntherapie	70
5.1.1 Der Transferrinrezeptor CD71	70
5.1.2 Das Aktivierungsmolekül CD69	71
5.1.3 Das Molekülsystem CD40/ CD154 (CD40 Ligand)	72
5.1.4 Das Zelladhäsionsmolekül CD54	73
5.1.5 Die Immunglobuline A, M und G	75
5.2 Oberflächenmoleküle und membrangebundene Immunglobuline auf B- und T- Zellen gesunder Probanden	76
5.2.1 Der Transferrinrezeptor	76
5.2.2 Das Aktivierungsmolekül CD69	76
5.2.3 Der Molekülkomplex CD40/ CD154 (CD40 Ligand)	77
5.2.4 Das Zelladhäsionsmolekül CD54	78
5.2.5 Die Immunglobuline A, M und G	79
5.3 Klinik der SLIT	80
ZUSAMMENFASSUNG	81
QUELLENVERZEICHNIS	83
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	

AEC	Aminoethyl Carbazole
AID	Autoimmun Diagnostika
ARIA	Allergic Rhinitis and it's Impact on Asthma
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
CD	Cluster of Differentiation
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
EAACI	European Acadamy of Allergology and Clinical Immunology
FACS	Fluorescence Activated Cell Sorter
FEV ₁	Forciertes Expiratorisches Volumen in 1 Sekunde
FKS	Fetales Kälberserum
GM- CSF	Granulozyten- Makrophagen- Kolonie stimulierender Faktor
H ₁ - Rezeptor	Histaminrezeptor
HRP	Horseradish Peroxidase (Meerrettichperoxidase)
ICAM	Intercellulare Adhesion Molecule
IFN	Interferon
IG	Immunglobulin
IL	Interleukin
JAK	Januskinase
NH ₄	Ammonium
PBS	Phosphate Buffered Saline
PHA	Phytohämagglutinin
RPMI	Rockwell Park Memorial Institute
SIT	Spezifische Immuntherapie
SLIT	Sublinguale spezifische Immuntherapie
STAT	Signal Transducers and Activators of transcription
TH	T- Helfer- Zellen
TGF	Tranforming Growth Factor
TNF	Tumor Necrosis Factor
VP	Verdünnungspuffer
WHO	World Health Organization

1 EINLEITUNG

1.1 Epidemiologie allergischer Erkrankungen

Allergische Erkrankungen, wie allergisches Asthma, Heuschnupfen und das atopische Ekzem haben, in den letzten Jahrzehnten dramatisch zugenommen. (DGA und ADA 2003)

Die allergische Rhinokonjunktivitis, deren Prävalenz offenbar weiterhin steigt, ist mit einer Lebenszeitprävalenz von 20 Prozent eine der häufigsten allergischen Erkrankungen. (Bosquet J et al. 2001)

Allein die durch die allergische Rhinitis und ihre Komorbiditäten hervorgerufenen sozioökonomischen Folgen sind erheblich. Die direkten, indirekten und intangiblen Kosten für die allergische Rhinitis für das Gesundheitswesen und die Gesamtwirtschaft betrugen im Jahr 2000 in Deutschland ca. 240 Millionen Euro, die der allergischen Atemswegserkrankungen insgesamt mindestens 5,1 Milliarden Euro. (Ring J und Wenning J 2000, Statistisches Bundesamt.2000)

Auf der Suche nach Ursachen für diese Veränderungen sind sowohl endogene als auch exogene Faktoren zu diskutieren. So schätzte eine Studie an 11688 dänischen Zwillingspaaren den Anteil genetischer Faktoren hinsichtlich des Asthma bronchiale auf 73 Prozent. (Skadhange LR et al. 1999) Durch Familienuntersuchungen konnte ein starker Einfluss erblicher Komponenten auf die Ausbildung allergischer Erkrankungen belegt werden. (Sandford A et al.1996, Kjellman N 1977) Es können bestimmte chromosomale Regionen für ganz spezifische Immunglobuline (IL), Rezeptor- oder Transmitterproteine erkannt werden. Regionen in denen von mehreren Arbeitsgruppen Hinweise auf Kopplung mit Atopie- assoziierten Phänotypen beschrieben wurden, sind auf den langen Armen der Chromosomen 5, 11, 12 und 13 sowie auf dem kurzen Arm des Chromosoms 6 lokalisiert. (Sengler C und Nickel R 2002, Marsh DG et al. 1994, Cookson WO et al.1989)

Das allergene Umfeld scheint ebenfalls eine bedeutende Rolle zu spielen. Hier ist an die Exposition gegenüber Innenraumallergenen und Allergenen in der Umwelt zu denken. Ein potentiell Indoor-Allergen stellen Milben dar. In mehreren Studien konnte gezeigt werden, dass die Exposition gegenüber Milben- und Katzenallergenen mit einem erhöhten Risiko einer Sensibilisierung einhergeht. (Wahn U et al. 1997, Lau S et al. 2000, Mösken H 1995)

Als ein weiterer möglicher Faktor wird die Allergieförderung durch anthropogene Luftschadstoffe angesehen. Krämer et al konnten in ihrer epidemiologischen Studie zeigen, dass Pollensensibilisierungen in innerstädtischen Arealen mit zunehmender Verkehrsbelastung in ihrer Häufigkeit ansteigen und die Ausprägung von Symptomen mit zunehmender Belastung überproportional zunimmt. (Krämer U et al. 2001)

Anzumerken ist auch die Tatsache, dass das frühe Risiko einer Sensibilisierung bei denjenigen Kindern erhöht gefunden wurde, deren Mütter nicht nur vor und nach der Schwangerschaft, sondern bis zum Ende der Schwangerschaft in starkem Maße geraucht haben. Zudem zeigte sich beim Menschen und in verschiedenen Mausmodellen, dass allergische Ereignisse in der Schwangerschaft das Risiko einer allergischen Erkrankung im späteren Leben möglicherweise erhöht. (Uthoff H et al. 2003, Herz U et al. 2001, Kulig M et al. 1999)

Interessant ist auch der Fakt, dass atopische Erkrankungen in höher entwickelten Industrienationen mit westlichem Lebensstil verstärkt auftreten. (Issac Steering Committee 1998) Bjorksten et al konnten zeigen, dass die Prävalenz von asthmatischen Symptomen bei 13- und 14-jährigen Kindern in Finnland und Schweden 11,2– 19,7%, in Estland, Lettland und Polen 7,6– 8,5% und in Albanien, Russland, Georgien, Rumänien und Usbekistan 2,6– 5,9 % betrug. (Bjorksten B et al. 1998) Betrachtet man die Epidemiologie des atopischen Ekzems, so fielen höhere Prävalenzen für Nord-europa und Australien auf, während die Häufigkeit in Asien sowie Ost- und Zentral-europa niedriger zu sein scheint. (Williams H et al. 1999)

In der Betrachtung möglicher Ursachen allergischer Erkrankungen sind zudem Infektionen im Kindesalter zu bedenken. So gibt es deutliche Hinweise darauf, dass früher Kontakt mit bakteriellen Antigenen, sowie frühkindliche virale Infekte vor einer möglichen späteren Erkrankung an Asthma schützen. (Gereda JE et al. 2000, Illi S et al. 2001, von Mutis E et al. 2000, von Ehrenstein OS et al. 2000) In diesem Zusammenhang ist interessant, daß bereits in der 11. Fetalwoche eine Immunglobulin E (IgE) Produktion möglich ist und schon während der ersten Lebensmonate spezifische IgE-Antworten vor allem gegen Nahrungsmittelallergene wie Kuhmilch und Hühnerei gebildet werden können. (Kulig M et al. 1999)

Zusammenfassend läßt sich feststellen, dass die Entwicklung einer allergischen Erkrankung einer multifaktoriellen Genese unterliegt. Entscheidend für die

Manifestation einer Allergie ist das Zusammenspiel der möglichen endo- und exogenen Faktoren.

1.2 Terminologie

Ursprünglich wurde der Begriff Allergie von Clemens von Piquet als eine veränderte Fähigkeit des Körpers auf eine Fremdsubstanz zu reagieren definiert. (von Piquet C 1906)

Heute zählt man die Allergie zu einer Klasse von Immunreaktionen, die man als Hypersensibilität oder Überempfindlichkeit bezeichnet. Man versteht darunter nachteilige Immunantworten, die Gewebsschäden hervorrufen und zu ernsthaften Erkrankungen führen können. Der Organismus reagiert dabei auf an sich unschädliche Umweltstoffe, die Allergene. Die hypersensiblen Reaktionen wurden von Coombs und Gell in 4 Typen eingeteilt. Die Allergie wird häufig mit der Hypersensibilitätsreaktion vom Typ 1 gleichgesetzt. Man kann sie aber auch als IgE – vermittelte Überempfindlichkeit vom Soforttyp bezeichnen. (Janeway CA et al. 2002)

Eine echte allergische IgE– vermittelte Überempfindlichkeitsreaktion kann erst nach wiederholtem Kontakt mit dem Allergen auftreten. Bei erstmaliger Exposition findet zunächst eine Sensibilisierung des Organismus statt. Davon zu unterscheiden ist die Pseudoallergie. Sie beschreibt eine Unverträglichkeitsreaktion, welche aber nicht durch eine Immunreaktion hervorgerufen wird.

Atopie bezeichnet eine individuelle oder familiär bedingte Tendenz, schon auf geringe Dosen von Allergenen, meist Proteine, IgE– Antikörper zu produzieren und dadurch typische Symptome wie Asthma, Rhinokonjunktivitis oder ein allergisches Ekzem / Dermatitis– Syndrom zu entwickeln. (Johansson SGO et al. 2001)

1.3 Allergene

Allergene sind Antigene, die Allergien hervorrufen. Die meisten mit IgE oder IgG– Antikörpern reagierenden Allergene sind Proteine. Bei der allergischen Kontaktdermatitis sind die klassischen Allergene niedrigmolekulare Chemikalien, die mit

T-Zellen reagieren. Diese niedrigmolekularen Chemikalien fungieren dabei als Haptene. (Johansson SGO et al. 2001)

Besitzen Allergene verschiedener Spezies die gleiche Molekülgröße, identische biologische Funktionen und mindestens 67 % Identität in der Aminosäuresequenz, so wird der Begriff Isoallergen benutzt. (WHO/IUS Allergen Nomenclature Subcommittee 1995)
Bei verschiedenen Allergenen können Kreuzreaktivitäten auftreten. Diese beruhen auf dem Vorhandensein gleicher Epitope.

Wichtige Faktoren im Hinblick auf die Potenz des Allergens stellen die Wiederholung bestimmter Epitopmuster, die Löslichkeit, der Fremdheitsgrad und die Konzentration dar. Im Zusammenhang damit haben sich die Begriffe Major- und Minorallergen bewährt. Das Allergen wird in Abhängigkeit davon, ob mehr oder weniger als 50 % der getesteten Patienten mit dem entsprechenden spezifischen IgE reagieren, als major oder minor bezeichnet. (Lowenstein H. 1980)

Die WHO- Nomenklatur der Allergene sieht vor, dass die ersten 3 Buchstaben die Gattung und der folgende die Art bezeichnet. Die arabischen Zahlen werden entsprechend der Entdeckung zugeordnet. Als Beispiel sei hier Der f 1 genannt, was *Dermatophagoides farinae* 1 bedeutet. (WHO/IUS Allergen Nomenclature Subcommittee. 1995)

Die Sensibilisierung des Organismus kann durch Inhalations- und Kontaktallergene sowie durch Nahrungsmittel- und Injektionsallergene, wie Insektengift, erfolgen. Entsprechend des Auftretens eines Allergens über das Jahr hinweg werden saisonale und perenniale Allergene unterschieden.

Einen Überblick über ausgewählte Inhalationsallergene zeigt Tabelle 1 (Tab.1).

Tab.1: Übersicht über ausgewählte perenniale Inhalationsallergene

Allergenquelle	Allergen
Milben	
Dermatophagoides farinae (Mehlstaubmilbe)	Der f 1-3
Dermatophgoides pteronyssinus (Hausstaubmilbe)	Der p 1-7
Haustiere	
Canis domesticus (Hund)	Can d 1, 2
Felis domesticus (Katze)	Fel d 1

1.4 Pathogenese

Die Hypersensibilitätsreaktion vom Typ I ist eine IgE– vermittelte Reaktion.

Die Immunantwort, die zur IgE – Erzeugung führt, besteht aus zwei Hauptkomponenten. Der erste Teil umfasst die Signale, die naive T- Helferzellen (Th0) dazu veranlasst zum Th2 – Phänotyp zu differenzieren. Zum zweiten Teil gehören die Aktivitäten von Cytokinen und costimulierenden Signalen von Th2– Zellen, die in B – Zellen den Wechsel zur IgE– Produktion stimulieren.

Die weitere Entwicklung einer naiven Th – Zelle, die auf ein von einer dendritischen Zelle präsentiertes Peptid reagiert, hängt von verschiedenen Faktoren ab; den Cytokinen, denen die Th0 – Zelle vor und während dieser Reaktion ausgesetzt war, sowie den spezifischen Eigenschaften des Antigens, von der Allergendosis und dem Präsentationsweg. (Janeway CA et al. 2002) Ebenso spielt auch die Dauer des Vorgangs eine Rolle. (Rogers PR et al. 1999) Interleukin 4 (IL- 4) begünstigt die Entwicklung von Th2 – Zellen, während Interleukin 12 (IL- 12) die Entwicklung von Th1– Zellen fördert.

IgE– Antikörper sind bei der Immunabwehr von Infektionen bei Parasiten von Bedeutung und dieses Abwehrsystem verteilt sich auf die Bereiche, wo Parasiten ein-

dringen können. Zellen des angeborenen und erworbenen Immunsystems in diesen Bereichen sind darauf spezialisiert, solche Zytokine freizusetzen, die Th2– Reaktionen auslösen. (Janeway CA et al. 2002) Ist die Differenzierung zu Th2 –Zellen erfolgt, so wird von diesen IL-4, IL-5, IL-9, IL-10 und IL- 13 sowie TGF –beta (tumor growth factor) in die Umgebung abgegeben. (Romagnani S et al. 1997, Janeway CA et al. 2002) IL-10 und TGF –beta hemmen die Aktivierung und Vermehrung von Th1–Zellen. IL- 4 und IL-13 treten mit Rezeptoren an der Oberfläche von B- Zellen in Wechselwirkung. Die Signalübertragung erfolgt durch Aktivierung der Janus– Tyrosinkinasen JAK 1 und JAK 3, wodurch der Transkriptionsfaktor STAT 6 aktiviert wird. Somit ist der Isotypenswitch zur IgE– Produktion möglich. Das zweite Signal für den Isotypenswitch zu IgE, ist eine costimulatorische Wechselwirkung zwischen dem CD40-Liganden (CD154) an der Oberfläche der T–Zelle und CD40 an der Oberfläche der B –Zelle. (Janeway CA et al. 2002, Niess JH et al. 2000) Diese Phase stellt die Sensibilisierung des Körpers auf das Allergen dar.

Sobald die Ig– Produktion eingesetzt hat, kann sie durch basophile Zellen, Mastzellen und eosinophile Zellen weiter verstärkt werden. Diese Zellen können an ihrer Oberfläche durch den hochaffinen IgE– Rezeptor IgE binden. Die Vernetzung von zellgebundenem IgE durch Allergene führt zur Aktivierung der Mastzelle am Eintrittsort des Allergens in das Gewebe. Eosinophile, Mastzellen und Basophile können miteinander in Wechselwirkung treten. IL-3, IL-5 und GM –CSF beeinflussen das Wachstum, die Differenzierung und Aktivierung von Basophilen und Eosinophilen. Eosinophile können durch Bildung des major basic protein eine Degranulation von Mastzellen und Basophilen verursachen. (Janeway CA et al. 2002)

Die Folge ist die Ausschüttung von inflammatorischen Lipidmediatoren, Cytokinen und Chemokinen. Diese Mediatoren tragen sowohl zur akuten als auch zur chronischen Entzündungsreaktion bei. Einer der wichtigsten Mediatoren ist das biogene Amin Histamin. Es führt zu einer erhöhten Gefäßpermeabilität, Kontraktion der glatten Muskulatur, Vasodilatation, Schleim- sekretion und Pruritus. (Bachert C. 2002)

Je nach Dosis des Antigens und seinem Eintrittsweg in den Körper sind die Konsequenzen der IgE– vermittelten Mastzellaktivierung sehr unterschiedlich. Die Symptome reichen von lästigen Heuschnupfenanfällen beim Einatmen von Pollen bis

hin zum lebensbedrohlichen Kreislaufkollaps der systemischen Anaphylaxie. (Janeway CA et al. 2002)

Diese Phase stellt die Effektormechanismen einer Allergie dar.

Bei erstmaligem Kontakt mit dem Allergen wird es vom Immunsystem zunächst als fremd erkannt und die beschriebene Sensibilisierung findet statt. Es kommt zur Prägung des Immunsystems gegenüber diesem Allergen, welche durch ein relatives Überwiegen der Th2 –Zellen charakterisiert ist. Dabei werden auch Gedächtniszellen geprägt, welche bei wiederholtem Kontakt schneller und auch ohne Zytokinkostimulation aktiviert werden. Auch die Mastzellen schütten bei wiederholtem Kontakt sofort ihre präformierten Hormone und Enzyme aus.

1.5 Diagnostik

Die Diagnose einer allergischen Erkrankung basiert auf einer Kombination aus Anamnese, klinischer Untersuchung, Hauttestungen, In- vitro– Diagnostik und Provokationstest. Letzterer dient der Beurteilung der Aktualität der Sensibilisierung. Die Erhebung der Anamnese mit möglichen allergieverdächtigen Symptomen stellt dabei den wichtigsten Teil der Diagnostik dar. Es fließen hier neben der Eigenanamnese, die Familienanamnese und bei Kindern eine Fremd– oder Elternanamnese ein. Mit Hilfe von Fragebögen können diese anamnestischen Angaben dokumentiert werden. Besonderer Wert kommt der Aufzeichnung der Arbeitsunfähigkeit bzw. deren Einschränkung, Schulabwesenheiten und Angaben zur Lebensqualität des Patienten zu. (Interdisziplinäre Arbeitsgruppe allergische Rhinitis der Sektion HNO 1 2003) Zur Ermittlung der Lebensqualität stehen unter anderem krankheitsspezifische und allgemeine psychomotorische Testverfahren zur Verfügung. (Juniper EF et al. 1991, Bousquet J et al. 1994)

Die klinische Untersuchung des Patienten dient der Beurteilung seines Phänotyps mit möglichen Atopiezeichen. Hieran kann sich aufgrund der Anamnese eine erweiternde dermatologische, pneumologische oder pädiatrische Diagnostik anschließen.

Hauttestungen stellen das wesentliche diagnostische Verfahren zum Nachweis IgE–vermittelter Sensibilisierungen dar. Dazu zählen der Skin– Prick– Test und bei negativem oder fraglichem positiven Prick–Test, aber anamnestisch deutlichen

Hinweisen auf eine Sensibilisierung, der Intrakutantest. (Interdisziplinäre Arbeitsgruppe allergische Rhinitis der Sektion HNO 1 2003) Zum Allergietest gehören neben der kompetenten Durchführung auch eine Relevanzprüfung durch den Testarzt und eine Beratung der Testperson bezüglich der Testergebnisse. (Klein-Tebbe J 2003)

Der Skin- Prick- Test hat bei richtiger Anwendung, gegenüber der Bestimmung des IgE- Gesamtspiegels und dem Atopy- Panel- Test den besten positiven Vorher – sagewert und höchste Effizienz, um respiratorische atopische Erkrankungen zu diagnostizieren. (Tschopp JM et al. 1998) Die Durchführung eines solchen Skin- Prick- Tests dauert ungefähr 15 Minuten und das Ergebnis kann sofort abgelesen werden. Vor einem Hauttest sollte die Einnahme von potenziell eine Reaktion supprimierenden Medikamente ausgeschlossen werden. Besonders zu beachten ist dabei die rechtzeitige Absetzung der Antihistaminika. Nach einem solchen Hauttest sollte sich eine ausreichende Beobachtungszeit anschließen, um eventuell auftretende anaphylaktische Reaktionen rechtzeitig zu erkennen. Das Management anaphylaktischer Reaktionen sollte daher vom Anwender beherrscht werden. (Interdisziplinäre Arbeitsgruppe allergische Rhinitis der Sektion HNO 1 2003) Ist ein Hauttest nicht durchführbar, so ist es möglich spezifische IgE- Antikörper im Serum zu bestimmen. Diese dienen seit drei Jahrzehnten dem Nachweis von Soforttypsensibilisierungen. (Hamilton RG and Kagey Sobotta A 2000) Eine solche In- vitro- Diagnostik ist indiziert bei Säuglingen und Kleinkindern, für den Hauttest ungeeigneten Allergenen oder ihn beeinflussende Medikamente. Bei Urticaria facita und generalisierten Hauterkrankungen kann ebenfalls diese Diagnostik erfolgen. (Klein-Tebbe J 2001)

Die Konzentration spezifischer IgE- Antikörper sollte idealerweise unter Berücksichtigung des Gesamt- IgE bewertet werden. Dieser muß altersabhängig interpretiert werden und kann atopische Individuen nicht von nicht atopischen Personen unterscheiden, denn Erkrankungen wie Parasitosen können ebenfalls mit einem erhöhten IgE- Gesamtspiegel einhergehen. (Interdisziplinäre Arbeitsgruppe allergische Rhinitis der Sektion HNO 1 2003) Zu beachten ist, dass die Qualität der Messergebnisse aufgrund unterschiedlicher Kalibrationsmethoden verschiedener Anbieter erheblich voneinander abweichen kann. (Fifield R et al. 1994)

Es werden immer mehr neue Marker gesucht, um die Diagnose einer Allergie einfacher und sicherer zu gestalten und die möglichst genau mit der klinischen

Symptomatik korrelieren. Hierzu wird besonders im Bereich von zellulären und humoralen Signalüberträgerstoffen und auf mikrobiologischer Ebene geforscht. Wichtig zu beachten ist, dass ein positiver Skin– Prick– Test oder eine Erhöhung des Gesamt– IgE und spezifischen IgE– Plasmaspiegel allein, ohne entsprechende Anamnese für die Diagnose eine Allergie nicht ausreichend ist.

1.6 Therapie

1.6.1 Prävention

Der Prävention allergischer Erkrankungen kommt der spezifischen Immuntherapie als kausaler Therapieansatz eine besondere Bedeutung zu, wenn man dem ansteigenden Trend der allergischen Erkrankungen begegnen will. Hierbei können drei Formen unterschieden werden. Die primäre Prävention als Verhinderung einer Sensibilisierung und die Sekundärprävention als Verhinderung der Krankheitsmanifestation. Unter tertiärer Prävention werden alle Maßnahmen verstanden, welche bei bereits symptomatischen Patienten das Ausmaß der Allergie reduzieren.

Präventionsmaßnahmen können schon früh durchgeführt werden. So konnte durch die evidenzbasierte und konsentierende Leitlinie des Aktionsbündnisses Allergieprävention, dass Stillen von mindestens vier Monaten als Empfehlung gegeben werden. Sofern Stillen nicht möglich ist, kann bei Risikokindern die Gabe von hypoallergener Säuglingsnahrung empfohlen werden. In mehreren Studien konnte gezeigt werden, dass hydrolysierte Nahrung aus Kaseinbasis gegenüber partiell hydrolysierte Nahrung protektiv überlegen bzw. der Vorzug zu geben ist. (Schäfer T et al. 2004)

Weitere Einfluss nehmende Faktoren sind die Haustierhaltung und die Gestaltung des täglichen Umfeldes des Kindes. Die strikte Meidung von Haustieren bei Risikokindern zur Primär –und Sekundärprävention können laut Leitlinie nicht auf –recht erhalten werden. Die erarbeiteten Empfehlungen ermöglichen differenzierte Aussagen bezüglich der Art des Haustieres, genetischer Vorbelastung und Form der atopischen Erkrankungen. Ebenso konnten Empfehlungen zu einem gesunden

Innenraumklima präzisiert werden. Zur Reduktion der Milbenallergenexposition hat das Encasing einen positiven Effekt. (Schäfer T et al. 2004, Schoencker I et al 2001, Ehnert B et al. 1992, Frederick JM et al. 1997) In Kombination mit einer spezifischen Immuntherapie konnte die bronchiale Hyperreagibilität bei asthmatischen Kindern gesenkt werden. (Paul K et al. 1998)

Als weiteres mögliches Mittel zur wirksamen Kontrolle der Hausstaubmilbe kann die Alternative zu den Akariziden, das Neempräparat Milbiol gesehen werden. Allerdings besteht hier die Aufgabe die Langzeitwirkung auf atopische Patienten zu klären. (Rembold H und Oetzel H 2004)

Als Präventionsmaßnahme ist auch die aktive und passive Exposition gegenüber Tabakrauch zu vermeiden, da er das Allergierisiko erhöht. Dies gilt auch während der Schwangerschaft. Das Aufwachsen in einem Raucherhaushalt erhöht das Risiko einer allergischen Sensibilisierung. (Gergen PJ et al. 1998, Schäfer T et al. 2004)

Ergänzend zu Präventionsmaßnahmen kommen die sowohl antiallergischen als auch antientzündlichen Pharmakotherapeutika und die spezifische Immuntherapie hinzu.

1.6.2 Pharmakotherapie

Die Pharmakotherapie allergischer Erkrankungen kann als symptomatische anti – allergische und antientzündliche Behandlung gesehen werden.

1.6.2.1 Kortikosteroide

Die Kortikoide wirken auf zellulärer Ebene indem sie mit transkriptionsregulierenden Rezeptoren interagieren. Die Transkriptionsrate von Zellmediatoren, Rezeptor – molekülen und Enzymen kann somit beeinflusst werden. (Delacourt C 1999) Aufgrund der Änderung der Proteinsynthese durch diese Medikamente, setzt ihre Wirkung erst mit Latenz ein. Der antientzündliche Effekt der Kortikosteroide beruht auf einer veränderten Synthese von IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, Tumornekrosefaktor– alpha (TNF- alpha), GM- CSF und Interferon- gamma (IFN- gamma). (Fokkens WJ et al. 1997, Bentley AM et al. 1996, Lüllmann H und Mohr K 1999)

Auch die Synthese von Zytokinrezeptoren, Leukotrienen, Prostaglandinen wird herabgesetzt. (Lüllmann H und Mohr K 1999) Die Zahl der zirkulierenden inflammatorischen Zellen, wie Lymphozyten, Mastzellen, Baso –und Eosinophile sowie

Makrophagen und Neutrophile wird verringert. (Meltzer EO 1997) Es konnte gezeigt werden, daß beim Asthma die bronchiale Hyperreagibilität sowie die Verdickung der Lamina reticularis rückläufig sind. (Hoshino M et al. 1998) Die Epithelregeneration und die mukoziliäre Clearance werden verbessert.

Ein weiterer wichtiger Aspekt ist, dass Kortikosteroide der Herabsetzung der beta-Rezeptoren entgegenwirken und so die Empfindlichkeit gegenüber den therapeutisch eingesetzten beta- Adrenergika verbessert wird. (Chung KF 1998) Die systemische Gabe von Kortikosteroiden beschränkt sich auf eine stark ausgeprägte atopische Symptomatik, massive Krankheitsausprägung und Behandlung anaphylaktischer Schocksituationen. Dennoch werden systemische Depotpräparate von Glukokortikoiden in der täglichen Praxis häufig eingesetzt, ohne dass hierfür ausreichende Studien vorlägen. (Mygind N et al. 2000)

Topisch werden Kortikosteroide bei Asthma, allergischer Rhinitis, Konjunktivitis und bei atopischer Dermatitis eingesetzt. (Lumry WR 1999) Glukokortikoide können heute als die effektivsten Arzneisubstanzen für die Therapie der allergischen Rhinitis gelten. (Bousquet J et al. 2001) Durch die lokale Gabe lässt sich bei kontinuierlicher Anwendung eine hohe Schleimhautkonzentration bei minimalem Risiko systemischer Nebenwirkungen erreichen. (Bonsmann U et al. 2001)

1.6.2.2 H1– Antihistaminika

Seit den achtziger Jahren ersetzen Antihistaminika der zweiten Generation ältere sedierende Substanzen. Kennzeichen sind eine geringere bzw. fehlende Sedierung und eine höhere Rezeptorspezifität. Sie zeigen einen guten Effekt auf die nasalen und nicht nasalen Symptome der durch saisonale und perenniale Allergene bedingten allergischen Rhinitis. (Bousquet J et al. 2001) H1– Antihistaminika finden ebenso bei allergischer Konjunktivitis, chronischer Urtikaria, Neurodermitis mit ausgeprägtem Juckreiz und bei der Therapie des anaphylaktischen Schocks Anwendung. (Graft DF 1996, Zuberbier T und Henz BM 1999, Soter NA 1990)

Neuere Untersuchungen bestätigen eine über den Rezeptor vermittelte Wirkung des Histamins auf verschiedene Entzündungszellen, die Histamin als Entzündungsmediator ausweisen. (Bachert C 2002) Die antientzündlichen Effekte sind dabei von der Stärke des H1- Antagonisten abhängig. Durch eine höhere Rezeptoraffinität neuerer

Antihistaminika können so auch klinische Effekte auf die nasale Obstruktion und die Symptome eines gleichzeitig bestehenden Asthma bronchiale bei allergischer Rhinitis beobachtet werden. (Brochard U 2003)

Basierend auf dem ARIA– Workshopreport und einer Stellungnahme der ARIA– Gruppe und der EAACI wird eine dritte Gruppe von Antihistaminika definiert. Diese Gruppe zeichnet sich unter anderem durch einen spezifischen, potenten H1– Rezeptorantagonismus, eine Wirksamkeit über 24 Stunden, additive antiallergische Effekte und keine Sedierung oder Beeinträchtigung der psychomotorischen Leistung aus. Diese Kriterien werden durch Desloratadin und überwiegend durch Levocetirizien und Fexofenadin erfüllt. (Bousquet J et al. 2003, Bousquet J et al. 2001)

1.6.2.3 Cromone

Die Wirkstoffgruppe Cromone umfasst Cromoglicinsäure und Nedocromil, deren Wirkweise nicht vollständig geklärt ist. Für die saisonale allergische Rhinitis konnte eine therapeutische Wirkung bei viermaliger täglicher Gabe in kontrollierten Studien nachgewiesen werden, jedoch nicht bei allen Untersuchungen. (Blair H and Herbert RL 1973, Holopainen E et al. 1971, Craig S et al. 1977)

Cromone sind bei Erwachsenen und Kindern weniger wirksam als orale oder topische Antihistaminika und topische Glukokortikoide. (Bousquet J et al. 1993, Fisher WG 1994, Schata M et al. 1991)

Eine Verminderung der bronchialen Hyperreagibilität, Rückgang der Frequenz und Schweregrad chronischer Symptome sowie eine verbesserte Lungenfunktion können bei Asthma durch Nedocromil erreicht werden. (Creticos PS 1996)

Nedocromil ist im Gegensatz zu Cromoglicinsäure bei saisonaler allergischer Rhinitis wirksamer als Plazebo. (Ruhno J et al. 1988)

1.6.2.4 Sympathomimetika

Die Hauptindikation der beta– 2– Sympathomimetika ist die Therapie des allergischen Asthma bronchiale. Sie werden als inhalative Bedarfsmedikation bei Luftnot oder als ergänzendes Medikament bei einer Glukokortikoidbasistherapie eingesetzt. Ebenso stehen sie aufgrund ihres schnellen Wirkungseintritts zur

Durchbrechung eines bereits eingetretenen Asthmaanfalls zur Verfügung. (Dolen WK 1996, Heino M 1994) Zur Soforttherapie des anaphylaktischen Schocks wird Adrenalin verwendet. Es wirkt bronchodilatatorisch und vermittelt ein Abschwellen der Bronchialschleimhaut. Die alpha-mimetische Wirkung des Adrenalins bewirkt eine Verbesserung der Kreislagsituation infolge der überwiegenden Vasokonstriktion.

1.6.2.5 Leukotrienrezeptorantagonisten

Leukotriene sind wesentliche Mediatoren der allergischen Entzündung. Sie bewirken eine Leukozytenimmigration, Steigerung der Gefäßpermeabilität, Gefäßerweiterung und Verengung der Bronchien. Ebenso stellen Leukotriene Chemotaxine für Eosinophile und Induktoren der Mukosesezernierung dar. (Rachelewsky G 1997)

Leukotrienrezeptorantagonisten können alleine oder in Kombination mit einem Antihistaminikum gegeben werden. (Meltzer EO et al. 2000) Eine Kombination mit inhalativen und systemischen Kortikoiden sowie beta-2 Sympathomimetika ist ebenfalls möglich. (Dahlen SE 1998, Roquet A et al. 1997) Die Kombinationstherapie mit nasal angewendeten Glukokortikoiden ist in etwa so wirksam wie eine Monotherapie mit einem nasalen Glukokortikoid. (Wilson AM et al. 2001)

1.6.2.6 Anticholinergika

In der Regel erfolgt die Anwendung topisch beim Asthma bronchiale. Bei nicht-allergischer und allergischer Rhinitis besitzen Anticholinergika eine dosisabhängige Wirkung auf die nasale Sekretion. (Kaiser HB et al. 1995, Dolovich J et al. 1987)

1.6.2.7 Methylxanthine

Methylxanthine bewirken eine Hemmung der Phosphodiesterase, wodurch es zu einer Erhöhung des zyklischen Adenosinmonophosphates (cAMP) kommt. Dies führt zu einer Bronchospasmolyse, aber auch zu einer Steigerung der Kontraktionskraft der Atemmuskulatur. Zudem besitzen sie eine erregende Wirkung auf das Zentralnervensystem und das Herz.

Theophyllin besitzt eine sehr geringe therapeutische Breite und wird durch Arzneimittelinteraktionen in seiner Pharmakokinetik beeinflusst, weshalb eine

Kontrolle des Plasmaspiegels wichtig ist. Theophyllin wird u.a. als Therapeutikum des Status asthmaticus angewendet.

Inhalative beta-2 Sympathomimetika sind der oralen Therapie mit Theophyllin aufgrund der Patientenbefindlichkeit und Effektivität vorzuziehen. (Pollard SJ et al. 1997)

1.6.2.8 Immunsuppressiva

Cyclosporin A und Tacrolimus sind zwei verschiedene Immunsuppressiva, die aber über den gleichen intrazellulären Rezeptor, das Immunophilin, in T– Lymphozyten wirken. (Kon OM and KayAB 1999) Es kommt zu einer Verminderung der Transkription von Zytokingenen durch mRNA. Diese Wirkung wird genutzt um Abstoßungsreaktionen nach Organtransplantationen zu verhindern. Ebenso können Immunsuppressiva auch bei Autoimmunkrankheiten versucht werden.

Weitere Studien konnten zeigen, dass auch bei atopischer Dermatitis und chronischer Urtikaria eine Verbesserung der Symptomatik eintritt, wenn mit Tacrolimus behandelt wird. (Bottari V et al. 1999, Toubi E et al. 1997)

Weiterentwicklungen haben topisch anwendbare Immunmodulatoren, wie Tacrolimuscreme hervorgebracht. Inzwischen ist die Wirksamkeit und Verträglichkeit der steroidfreien Tacrolimuscreme auch in Langzeitstudien belegt.

(Satellitensymposium Europäischen Akademie für Dermatologie und Venerologie 2002) Speziell für die Behandlung des atopischen Ekzems wurde Pimecrolimus entwickelt. In einer placebokontrollierten, randomisierten Multizenterstudie konnte Pimecrolimus als 1% Creme für wirksam und sicher befunden werden. Dennoch stehen Langzeitstudien diesbezüglich noch aus. (Eichenfield LF et al. 2002)

1.6.2.9 Anti- IgE- Antikörper

Humanisierte Anti- IgE- Antikörper wurden in verschiedenen Studien untersucht. Diese Therapie hat eine additive Wirkung zusammen mit einer spezifischen Immuntherapie, so dass diese Kombination vor allem bei polysensibilisierten Patienten Vorteile bringen könnte. (Kuehr J et al. 2002, Adelroth E et al. 2000, Casale TB et al. 1997)

1.6.3 Spezifische Immuntherapie (SIT)

Die spezifische Immuntherapie ist seit 1998 von der Weltgesundheitsorganisation als die bisher einzige kausale Therapie bei allergischer Rhinitis und Asthma anerkannt worden. Sie kann den natürlichen Verlauf allergischer Erkrankungen beeinflussen und den Ausbruch von Asthma verhindern. (WHO position paper 1998)

Zahlreiche kontrollierte Studien dokumentieren die Wirksamkeit und therapeutische Effektivität der spezifischen Immuntherapie. (Bousquet J et al. 1988, Haugaard L and Dahl R 1992, Haugaard L et al. 1993, Abramson MJ et al. 2000, Ross RN et al. 2000, Ross RN et al. 2000) Internationale Gremien (WHO), europäische Verbände und deutsche Fachgesellschaften empfehlen daher die SIT zur Behandlung allergischer Erkrankungen.

Die Reduktion des Medikamentenverbrauchs und die Steigerung der Leistungsfähigkeit bzw. die Verringerung von Fehlzeiten macht die SIT auch unter ökonomischen Gesichtspunkten zu einer wirtschaftlichen Behandlungsform. (Büchner K and Siepe M 1998, Donahne JG et al. 1999)

Eine spezifische Immuntherapie ist indiziert bei Patienten mit nachgewiesener, klinisch relevanter Sensibilisierung gegenüber Soforttypallergenen, deren Exposition beziehungsweise Provokation klinische Beschwerden verursacht. (Klein-Tebbe J et al. 2000) Zudem muss das für die Immuntherapie genutzte Allergen bzw. die Allergengruppe eine durch klinische Studien belegte Effektivität und Sicherheit aufweisen. (Malling HJ and Weeke B 1993)

Unter den ganzjährigen allergischen Atemwegserkrankungen ist ein therapeutischer Effekt der SIT bei Beschwerden durch Hausstaubmilben gut belegt. (Blainey AD et al. 1984, Pichler CE et al. 1997) Bei allergischem Asthma bronchiale hat die SIT einen positiven Einfluss auf bronchiale Symptome und / oder den Bedarf an antiasthmatischer Medikation. (Blainey AD et al. 1984, Bousquet J et al 1989) Dies gilt jedoch nur, wenn nicht bereits irreversible Sekundärveränderungen an den Atemwegen vorliegen. (Malling HJ and Weeke B 1993)

Die SIT ist bei Hymenopterengiftsallergien eine hocheffektive Behandlung und zeigt im Vergleich zu allen anderen Allergenen die beste Wirksamkeit. (Rueff F et al. 2000, Müller U et al. 1992, Mosbech H et al. 1986, Golden DB et al. 1981) Bezüglich der praktischen

Durchführung und Therapieschemata einer sublingualen Immuntherapie (SLIT) wird auf den Abschnitt Material und Methoden verwiesen.

Bei der Entscheidung zur spezifischen Immuntherapie sind einige relative und absolute Kontraindikation zu berücksichtigen. Dazu gehören ein persistierendes bzw. unzureichend behandeltes Asthma bronchiale und / oder irreversible Atemwegsobstruktion. Das heißt ein FEV1 von unter 70% des Sollwertes trotz adäquater Pharmakotherapie. (Bousquet J et al. 1998) Eine Medikation mit Betablockern, in lokaler und systemischer Form, erhöht unter SIT das Risiko von unerwünschten Atemwegsreaktionen und birgt die Gefahr, dass eine im Notfall erforderliche Adrenalingabe weniger effektiv ist. (Hepner MJ et al. 1990) Kardiovaskuläre Erkrankungen und Hyperthyreose mit erhöhtem Risiko für Nebenwirkungen nach Adrenalingabe sollten beachtet werden. Bei schweren Erkrankungen des Immunsystems, wie Autoimmunleiden, Immundefizienzen, Immunsuppression oder schweren Infektionskrankheiten sollte eine SIT sorgsam überdacht werden. Maligne Tumorerkrankungen mit aktuellem Krankheitswert, zählen wie die Schwangerschaft ebenfalls zu den Kontraindikationen für eine SIT. (Bousquet J et al. 1998) Besteht eine lebensbedrohliche Allergie durch Insektengift, so ist die Fortsetzung einer bereits vor der Schwangerschaft begonnenen spezifischen Immuntherapie ratsam. (Rueff F et al. 2000) Eine unzureichende Compliance des Patienten kann ebenso eine Kontraindikation dieser Behandlungsform darstellen. (Bousquet J et al. 1998)

Im Laufe der SIT können unerwünschte lokale und selten auch systemische allergische Reaktionen bis hin zum anaphylaktischen Schock auftreten.

Anhand der vom Paul –Ehrlich –Institut zwischen 1991 und 2000 gemeldeten Daten für schwere, lebensbedrohliche systemische Reaktionen wurde eine Inzidenz von 0,002 % bis 0,008 % bei nichtmodifizierten und 0,005 % bis 0,01 % bei modifizierten Semi– Depot– Extrakten errechnet. (Lüderitz-Püchel U et al. 2001)

Solche Ereignisse sind aufgrund von Risiko- faktoren zum Teil vorhersehbar und durch Umsicht und Prophylaxe in Art und Weise teilweise vermeidbar. (Malling HJ 2000)

Schwerste Reaktionen traten oftmals als asthmabedingte heftige Bronchialobstruktion und seltener als anaphylaktischer Schock auf. Tödliche Reaktionen fanden sich vermehrt bei Asthmaexazerbation, gleichzeitiger Gabe von Betablockern, systemisch unangepasster Dosissteigerung, Nichtbeachtung der Wartezeit oder

anschließende Kreislaufbelastung. (Klein-Tebbe J et al. 2000) Systemische Reaktionen können kurze Zeit nach Injektion einsetzen und müssen wegen der Gefahr der Verschlimmerung ohne Verzögerung behandelt werden. (Tryba A et al. 1994)

Sowohl für eine zuverlässige Diagnosestellung als auch für eine erfolgreiche Immuntherapie ist die Standardisierung der eingesetzten Allergene eine wichtige Voraussetzung. (Dreborg S and Frew A 1993)

Zur spezifischen Immuntherapie werden sowohl Therapeutika mit fester, vom Hersteller vorgegebener Zusammensetzung als auch patientenspezifische Präparate nach ärztlicher Rezeptur eingesetzt. (Klein-Tebbe J et al. 2003)

Seit ihrer Einführung 1911 durch Freeman und Noon wird die Immuntherapie als Desensibilisierungsbehandlung durchgeführt. (Freeman J 1911, Noon L 1911) Dennoch ist über ihren genauen Wirkmechanismus trotz intensiver Forschung noch vieles unbekannt. Auf mögliche Wirkprinzipien der SIT, wie der Einfluss auf das TH1– TH2–Verhältnis oder die Beeinflussung von Effektorzellen wird im einzelnen am Abschnitt Diskussion eingegangen.

2 ZIELE DER ARBEIT

Im Rahmen dieser Arbeit werden bei Allergikern vor Therapie und Allergikern unter sublingualer bzw. subkutaner Therapie sowie bei gesunden Kontrollpersonen verschiedene Oberflächenmoleküle, Interleukine und Immunglobuline in Lymphozyten unter Allergenstimulation in vitro untersucht.

2.1 Arbeitshypothesen

Folgende Hypothesen sollen anhand der durchgeführten Messungen überprüft werden:

1. Es lassen sich Veränderungen der Expression von Oberflächenantigenen (CD71, CD69, CD40, CD54, CD154) und membrangebundenen Immunglobulinen (IgA, IgM, IgG) auf Lymphozyten von Milbenallergikern vor einer sublingualen Immuntherapie unter Stimulation mit Milbenallergen im Vergleich zu nicht relevanten Allergenen und zu gesunden Probanden feststellen.
2. Es lassen sich bezüglich der Expression von CD71, CD69, CD40, CD54, CD154 sowie der Immunglobuline A, M und G bei Milbenallergikern unter sublingualer Immuntherapie unter Stimulation mit Milbenallergen und Erlen- bzw. Birkenallergen Veränderungen beobachten.
3. Unterschiedliche Allergene haben die Fähigkeit gemein, auch bei Gesunden einen Mechanismus zu induzieren, der eine Sensibilisierung begünstigt. Dies könnte sich in der Allergeninduzierten Expression Allergie-relevanter Oberflächenmoleküle (CD69, CD71, CD40, CD54, CD154, IgA, IgM und IgG) widerspiegeln.
4. Die Messung von Allergen-induzierter Expression von Oberflächenmolekülen und membrangebundenen Immunglobulinen kann als ergänzendes Verfahren neben der Klinik zur Verlaufskontrolle einer SLIT herangezogen werden.
5. Die Expression der Interleukine IFN- gamma, IL- 4, IL- 10 und IL- 13 zeigen eine Veränderung während einer Ultra- Rush- Therapie bei einer Wespengiftallergie unter Wespengiftallergenstimulation in vitro.

3 MATERIAL UND METHODEN

3.1 Patientengut und Blutprobengewinnung

Die in dieser Arbeit dargestellten Daten wurden durch Blutuntersuchungen an zwei unterschiedlichen Patientengruppen erhoben. Als Untersuchungsmethoden dienten durchflußzytometrische Messungen verschiedener Oberflächenmarker mittels fluorescence activated cell sorter (FACS), sowie die Analyse der Zytokinproduktion der Lymphozyten mit Hilfe von Elispot- Tests der Autoimmundiagnostika GmbH (AID).

Die Bestimmung der Oberflächenmarker erfolgte an Blutproben von Kindern des Robert- Koch- Krankenhauses Apolda. Diese befinden sich aufgrund ihrer atopischen Erkrankung in ständiger ambulanter Behandlung der Kinderklinik. Dabei wurde für die Untersuchung nur Blut von Kindern einbezogen, welche eine gesicherte Milbenallergie aufwiesen. Das Vorliegen einer solchen Allergie wurde durch Erhebung der Anamnese und der Bestimmung von spezifischem IgE sowie des CAP- Wertes bestätigt. Aus diagnostischen Gründen war es notwendig eine regelmäßige venöse Blutabnahme bei den Patienten durchzuführen. Zusätzlich hierzu wurden maximal 3 ml bis 5 ml Blut für die in dieser Arbeit dargestellten Untersuchungen verwandt. Die Blutabnahme erfolgte vor dem Beginn der spezifischen sub- lingualen Immuntherapie (SLIT) bei n= 24 Patienten. Ebenso wurde periphervenöses Blut von Kindern unter SLIT abgenommen (n= 12), welche nicht identisch zu den Kindern vor Therapie waren. Es ergab sich somit eine unverbundene Stichprobe. Die Kinder unter SLIT befanden sich zum Zeitpunkt der Blutabnahme in einem Behandlungszeitraum von 1 bis 3 Jahren.

Eine andere Patientengruppe wurde von Erwachsenen (n= 8) gebildet, welche unter einer Wespengiftallergie leiden. In der Hautklinik der Universität Jena wurden diese Patienten mittels subkutaner Immuntherapie (SCIT) behandelt. Auch bei dieser Gruppe ist eine regelmäßige venöse Blutabnahme aus diagnostischen Gesichtspunkten notwendig. Dabei wurden jeweils 4 ml bis 6 ml Blut vor und nach der Immuntherapie für diese Arbeit zur Verfügung gestellt. Dieses Blut wurde nur dem Elispotttest zugeführt.

Durch Erhebung der Anamnese sowie Durchführung verschiedener Hauttests konnte

die Diagnose einer Wespengiftallergie gestellt werden. Zu diesen Hauttests zählten ein Intrakutantest und ein Pricktest. Zusätzlich dazu wurde das spezifische Immunglobulin E im peripheren Blut bestimmt und ein Westernblot durchgeführt. Bei beiden Analysemethoden wurde Blut gesunder Probanden auf die gleiche Weise bearbeitet und untersucht wie bei den Allergikergruppen. Für die FACS Analyse wurden $n=15$, für den Elispotttest $n=4$ gesunde Probanden untersucht.

3.2 Probenbearbeitung

Das in NH – 4- Heparinmonovetten abgenommene Venenblut wurde aus technischen Gründen als Vollblut bei Zimmertemperatur einen halben Tag gelagert bevor es für die FACS- Messung weiterverarbeitet wurde. Das für den Elispot- Test verwendete Blut wurde ebenfalls in NH- 4- Heparinmonovetten abgenommen, aber nicht gelagert. Mit dem Ziel der Lymphozytenisolierung fand eine Auftrennung der zellulären Bestandteile des Venenblutes statt. Da die Lymphozyten später einer dreitägigen Inkubation unterlagen, musste eine Bearbeitung unter sterilen Bedingungen erfolgen. Hierzu wurde an einem sterilen Arbeitsplatz gearbeitet, sterile Einmalprodukte sowie autoklavierte Arbeitsmaterialien verwendet. Alle genutzten Lösungen und Chemikalien unterlagen ebenfalls den Anforderungen der Sterilität.

3.2.1 Lymphozytenseparation

Die Isolierung der Lymphozyten erfolgte mit Hilfe des Ficoll- Isopaque- Dichtegradienten ($1,007 \text{ g / ml}$). Dazu wurden auf eine 3 ml umfassende Ficolllösung 3 ml bis 5ml Venenblut langsam aufgeschichtet um eine Durchmischung beider Flüssigkeiten zu vermeiden. Anschließend wurde, zur Verdünnung des aufgeschichteten Blutes, im Verhältnis 1:1 eine RPMI 1640 Lösung hinzugegeben. Dieser Probenansatz wurde 20 Minuten mittels einer Zentrifuge vom Typ Labofuge bei 2500 g zentrifugiert. Nach Beendigung der Zentrifugation stellte sich die rote Fraktion der zellulären Blutbestandteile als Sediment der Auftrennung dar. Auflagernd auf diese folgten die Ficolllösung, die weiße Fraktion der später verwendeten Lymphozyten sowie das Blutserum. Die 1640 RPMI Lösung bildete als Überstand die oberste Schicht dieser Auftrennung. Die weiße Fraktion der Lymphozyten konnte nun mit

Hilfe einer Eppendorfpipette in ein neues Reagenzröhrchen abgenommen werden und wurde anschließend einem weiteren Waschgang unterzogen. Dazu wurde die Lymphozytenlösung bis auf 10 ml Gesamtvolumen mit 1640 RPMI versetzt. Nach wiederholter Zentrifugation bei 800 g mit der Labofuge setzten sich die Lymphozyten am Boden des Reagenzglases ab. Nun konnte die überstehende Waschlösung bis auf 1 ml Gesamtlösung mittels Pipette reduziert werden. Da für die weiterführenden Arbeiten eine bestimmte Population an Zellen nötig war, mussten die Lymphozyten mittels einer Neubauerzählkammer ausgezählt werden. Die in dieser Lösung vorliegende Zellzahl konnte anschließend mit 1640 RPMI Lösung bis auf die gewünschte Anzahl an Zellen verdünnt werden. Da die Zellpopulation drei Tage angezüchtet werden sollte, wurde zusätzlich fetales Kälberserum (FKS) als Zellkulturmedium hinzu gegeben. Der Anteil an FKS betrug zehn Prozent der Gesamtlösung. Diese konnte nun in drei Probenansätze bei Milbenallergikern und in fünf Ansätze bei gesunden Probanden aufgeteilt werden.

3.3 Ansätze zur FACS- Messung

Das Lösungsvolumen für die FACS- Untersuchung betrug zwischen 800 µl und 1 ml pro Ansatz, die eine Zahl zwischen 800 000 und 1,5 Millionen Zellen enthielten. Nachdem die Ansätze auf eine Mikrotiterplatte aufgeteilt waren, wurde eine Probe nativ belassen, eine zweite mit dem Milbenallergen und eine dritte Probe mit einem für den Patienten irrelevanten Allergen versetzt. Genutzt wurde dafür wahlweise Erlen- und Birkenallergen. Die Menge des hinzugefügten Allergens betrug 10 µl. In der Gruppe der gesunden Probanden fand zusätzlich ein Katzenallergen Anwendung. Ebenso wurde in dieser Gruppe auch ein Ansatz ohne Allergenzusatz untersucht. Anschließend wurden diese Zellsuspensionen für 72 Stunden bei 37 °C in einem CO₂ Brutschrank inkubiert. Nach dieser dreitägigen Inkubation wurden die Lösungen mittels Eppendorfpipette in 1 ml Reagenzröhrchen umgefüllt. Um die folgende Antikörpermarkierung durchzuführen wurden die Lösungen auf jeweils 500 µl reduziert. Vor dieser Reduktion war eine weitere Zentrifugation notwendig. Diese wurde in einer Biofuge für 10 Minuten bei 2500 g durchgeführt. Die Lymphozyten hafteten am Boden des Reagenzröhrchens und der Überstand konnte somit abpipettiert werden. Die drei beziehungsweise fünf ursprünglichen Ansätze wurden

nun noch einmal in je fünf Ansätze mit je 50 µl Zelllösung aufgeteilt um verschiedene Antikörpermarkierungen vornehmen zu können. Dabei wurden drei unterschiedliche Antikörper pro Ansatz verarbeitet.

Die verwendeten Antikörperkombinationen werden in der im Folgenden aufgeführten Tabelle 2 dargestellt. Als T- Zellmarkierung diente dabei anti- CD3, als B- Zellmarkierung anti- CD20.

Tab. 2: Übersicht verwendeter Antikörperkombinationen der jeweiligen Zellkulturansätze

	Antikörperkombination
Ansatz 1	CD3 + CD71 + CD69
Ansatz 2	CD20 + CD71 + CD69
Ansatz 3	CD20 + IgA + IgM
Ansatz 4	CD20 + IgG + CD40
Ansatz 5	CD3 + CD54 + CD154

Die Menge der Antikörper war mit 2,5 µl angesetzt, später konnte diese Menge jedoch auf 2 µl reduziert werden, da dies nicht zu einer Veränderung der Messergebnisse führte. Die Antikörper wurden in Abstand zueinander mittels Pipette an den Rand des Reagenzröhrchens gebracht, um eine gegenseitige Vermischung und vorzeitige Durchmischung mit der Zellsuspension zu verhindern. Im Anschluss an die Antikörpermarkierung der Zellen fand eine weitere Zentrifugation, zwecks gleichmäßiger Vermischung der Substanzen, statt. Diese wurde in einer Zentrifuge Typ Biofuge für 10 Sekunden durchgeführt. Die Zelllösung konnte nun nach einer 20 minütigen Inkubationszeit der Messung mittels eines FACS- Gerätes zugeführt werden. Im Falle der späteren Messung konnten die Zellen mit Hilfe von 0,05 prozentiger Formaldehydlösung fixiert werden.

3.3.1 Ermittlung der verwendeten Allergenkonzentration

Die Bestimmung der zu verwendenden Menge an Allergen wurde mittels FACS- Messung der Oberflächenmarker CD69 und CD25 auf B- Zellen sowie auf T- Zellen unter aufsteigender Stimulationsmenge des Milbenallergens durchgeführt.

Untersucht wurde Blut gesunder Probanden und Blut von Milbenallergikern. Als Voraussetzung für diese Messung musste auch hier eine Lymphozytenseparation nach dem im Punkt 3.2.1 beschriebenen Schema erfolgen. Die Lymphozytenzahl der Gesamtlösung lag dabei zwischen 800 000 und 1,5 Millionen Zellen pro Milliliter Lösung. Anschließend wurde diese Suspension auf 16 Reagenzröhrchen pro gesundem Proband und Milbenallergiker aufgeteilt, wobei pro Reagenzröhrchen 50 µl Zelllösung verwendet wurden. 8 der 16 Ansätze wurden dabei für die B-Zellreihe verwendet, die übrigen 8 Ansätze für die zu untersuchende T-Zellreihe. Pro B-Zell und T-Zellreihe wurden diese 8 Ansätze nochmals in je 4 Ansätze für die Markierung mit CD69 und CD25 unterteilt. Vier Ansätze pro Markierung und zugehöriger Zellreihe waren nötig, da vier unterschiedliche Volumina des Milbenallergens getestet werden sollten. Diese Volumina umfassten aufsteigend 0 µl, 10 µl, 100 µl und 1000 µl Allergen. Nach der Allergenzugabe und 72 stündiger Inkubation im CO₂-Brutschrank erfolgte die Antikörpermarkierung. Die Menge der Antikörper belief sich auf 2,5 µl pro verwendeten Antikörper. Zur Anwendung kamen für die B-Zellmarkierung CD20 sowie CD3 zur Markierung der T-Zellen. Der Versatz der Zelllösung mit Antikörpern erfolgte mittels Pipette an den Rand des Reagenzröhrchen. Zu beachten war auch hier, dass sowohl eine Durchmischung der Antikörper untereinander als auch eine frühzeitige, ungleichmäßige Durchmischung mit der Zelllösung verhindert wurde. Im Anschluss daran wurden die Ansätze mittels der Biofuge für 10 Sekunden zentrifugiert und konnten mit Hilfe des FACS-Gerätes ausgewertet werden. Die Auswertung dieser Messung ergab den späteren Einsatz von 10 µl Allergenlösung. Für nähere Erläuterungen bezüglich dieser Messung und deren Ergebnisse wird auf die nachfolgenden Kapitel dieser Arbeit verwiesen.

3.3.2 Bedeutung der untersuchten Antigene

In dieser Arbeit fanden monoklonale, mit verschiedenen Fluorochromen markierte Antikörper der Firmen DAKO und Immunotools Verwendung.

Es wurden gegen insgesamt dreizehn Zelloberflächenantigene Antikörper eingesetzt. Dazu gehört das CD3, ein von Thymozyten und T-Zellen gebildetes Antigen. Es ist mit dem Antigenrezeptor der T-Zelle assoziiert, dient der Signalvermittlung und ist notwendig für die Oberflächenexpression des T-Zellrezeptors. CD20 wird von

B- Zellen exprimiert. Verwendet wurde auch anti- CD69. CD69 ist ein von aktivierten B- und T- Zellen, natürlichen Killerzellen, neutrophilen- und eosinophilen Granulozyten sezerniertes Molekül, dessen Funktion noch nicht genau bekannt ist. Das Oberflächenantigen

CD71 (Transferrin- Rezeptor) wird von proliferierenden Zellen gebildet und gilt als allgemeiner Aktivierungsfaktor. CD25 wird von aktivierten T- Zellen, B- Zellen und Monozyten exprimiert. Es bildet die alpha- Kette des IL- 2 Rezeptors und ist assoziiert mit CD122 und der Interleukin- 2R- gamma- Kette.

Das Oberflächenantigen CD40 hat die Funktion eines Rezeptors für costimulierende Signale an B- Zellen durch T- Zellen. Es bindet den CD40– Liganden (CD154) und wird von aktivierten CD4- T- Helferzellen exprimiert. Ebenfalls eingesetzt wurde anti- CD54. CD54 wird von hämatopoetischen und nicht hämatopoetischen Zellen gebildet. Es ist ein interzelluläres Adhäsionsmolekül und wird auch als ICAM- 1 bezeichnet. CD54 bindet das CD11a / CD18- Integrin, welches von Lymphozyten, Granulozyten, Monozyten und Makrophagen exprimiert wird. Als CD40- Ligand funktioniert CD154, welches von aktivierten T- Zellen sezerniert wird. Ebenso wurden mittels der FACS- Messung verschiedene membrangebundene Immunglobuline (Ig) untersucht. Dazu gehörten IgA, IgM und IgG. Die Immunglobuline werden von B- Zellen gebildet und können als membranständig oder in einer sezernierten Form vorliegen. Die membranständige Variante bildet dabei den Antigenrezeptor der B- Zelle, die sezernierte Form wird von differenzierten B- Zellen den Plasmazellen produziert und weist dieselbe Antigenspezifität wie der B– Zellrezeptor auf. Die Immunglobuline bilden einen Teil der humoralen Immunität. IgA kommt gehäuft im Intestinaltrakt und in Sekreten wie Speichel, Darminhalt, Milch oder dem Nasen- und Bronchialsekret vor. Es dient hier dem Oberflächenschutz gegen lösliche Antigene und infektiöse Agenzien. Auf der Oberfläche naiver B- Zellen wird bei der primären Immunantwort IgM exprimiert. Die Wirkung von IgM richtet sich hauptsächlich gegen Mikroorganismen. IgG ist das im Serum am häufigsten vorkommende Immunglobulin. Es ist ebenfalls Teil der humoralen Immunität, spielt aber auch bei der allergischen Reaktion vom Typ II und Typ III eine wichtige Rolle. (Kayser FH et al. 2001)

3.3.3 FACS- Messung

FACS bedeutet fluorescence activated cell sorter und ermöglicht den Phänotyp von Zellen zu untersuchen. Dazu zählt die durchflusszytometrische Analyse der Expression unterschiedlicher Oberflächenmarker. Es ist ein optisches Meßgerät. Das optische System des Durchflußzytometers setzt sich aus verschiedenen Filtern und Spiegeln zusammen. Als Lichtquelle dient ein Argonionenlaser. Während die Zellen die Messkammer durchfließen, passieren sie den Laserstrahl. Das dabei entstehende Streulicht wird gemessen und ist bezüglich der Zellgröße und Granularität aussagekräftig. Durch Markierung der Zellen mit einem fluorchromhaltigen Antikörper, ist es möglich zusätzlich die Fluoreszenz zu messen. Damit ist es möglich einen Bezug zur Anzahl und Dichte der markierten Epitope herzustellen.

Streulicht und Fluoreszenz können somit zusammen eine Aussage über bestimmte Eigenschaften einer Zelle liefern. Die Ergebnisse der Messung werden in einer Dot – Plot Graphik dargestellt. Da nur eine bestimmte Population der Zellen für die Auswertung eine Relevanz besitzt, ist es notwendig diese auszuwählen. Durch Legen eines Softwarefensters um die Zellwolke, deren Eigenschaften näher untersucht werden sollen, aus dem Englischen eingedeutscht, dass Gaten, kann eine solche Auswahl erfolgen. Im Anschluß daran können nun verschiedene rechnerische Werte ermittelt werden, welche für die jeweilige Untersuchung relevant erscheinen. In Bezug auf diese Arbeit wurden mit dem Durchflußzytometer verschiedene von B – und T- Lymphozyten sezernierte Oberflächenmarker gemessen. Anschließend konnten verschiedene Zahlenwerte berechnet werden, welche Aussagen bezüglich des prozentualen Anteils eines bestimmten Antigens lieferten.

Die Abbildung 1 zeigt eine solche FACS- Messung und deren Resultat als eine Dot-Plot– Darstellung. Die Zellen sind dabei als Punktwolke und ohne Auswahl einer bestimmten Zellpopulation dargestellt. Gemessen wurden hier die prozentualen Anteile der CD3 positiven (CD3+) Zellen, sowie die prozentualen Mengen von CD71 und CD69 die zum einen durch die CD3+ Zellen gebildet werden und von anderen Zellen produziert werden. Zudem wurden auch die Zellen gemessen, die weder CD3 positiv noch CD71 oder CD69 positiv waren.

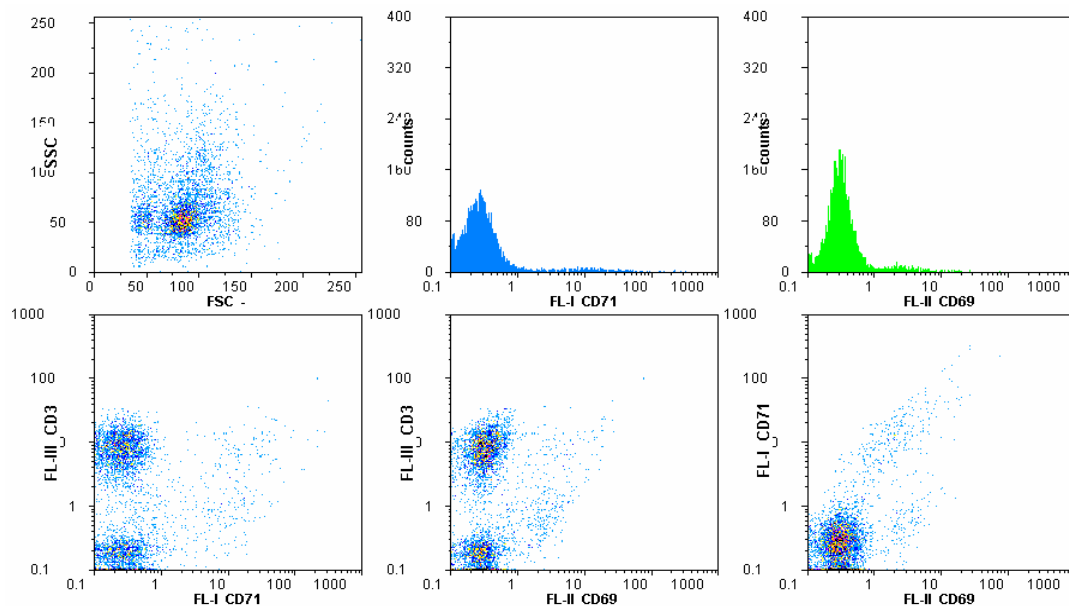


Abb.1: Beispiel einer Dot- Plot- und Histogramm (oben mitte und oben rechts) Darstellung der durchflusszytometrischen Bestimmung der CD3, CD71 und CD69 Expression auf Lymphozyten. Das obere linke Feld zeigt auf der x- Achse (FSC- forward scatter) die relative Größe, die y- Achse (SSC- side scatter) die relative Granulation der Zellen.

3.4 Elispot

3.4.1 Prinzip

Mit Hilfe des Elispot ist es möglich ganz spezifisch die Sekretion einzelner Zellen zu messen. Die Platten sind bereits von der Firma AID mit dem Antikörper des zu bestimmenden Zytokins versetzt. Das von den unterschiedlich stimulierten Zellen sezernierte Zytokin kann so von seinem Antikörper gebunden werden. Nach der Inkubationszeit und mehreren Waschschritten kann der mit Biotin markierte Nachweis- Antikörper aufgetragen werden. Nach nochmaliger Inkubation und Waschung kann die Zellreaktion mittels einer Substratlösung als farbiger Punkt (Spot) dargestellt werden. Nach Auszählung dieser Punkte durch den AID Elispot- Reader kann somit die Anzahl der Zytokin produzierenden Zellen angegeben werden.

3.4.2 Patienten

Für die Elispot- Ansätze wurden Lymphozyten des venös-peripheren Blutes von n= 8 erwachsenen Wespengiftallergikern aus der Hautklinik der Friedrich- Schiller- Universität Jena untersucht. Ebenso wurde von diesen 8 Patienten peripher-venöses Blut nach dreitägiger spezifischer subkutaner Immuntherapie abgenommen und dem Elispot- test zugeführt. Parallel dazu erfolgte die gleiche Untersuchung an n= 4 erwachsenen Gesunden.

3.4.3 Bedeutung der untersuchten Zytokine

Mit Hilfe des Elispot- Test der Firma AID wurde die Interleukinproduktion der Lymphozyten bestimmt. IL- 4 ist ein TH2- Zytokin das in B- Zellen den Isotypenswitch der Immunglobuline zu IgE und IgG fördert, welche eine maßgebliche Rolle bei allergischen Reaktionen des Typ- I spielen. Es unterdrückt zusätzlich auch die proentzündlichen Eigenschaften der Makrophagen.

Ebenfalls ein TH2- Zytokin stellt IL- 13 dar. Diesem Interleukin kommt eine Funktion sehr ähnlich dem IL- 4 zu. IL- 10 kann allgemein die Immunantwort hemmen. Das gemessene IFN- gamma wird von TH1- Zellen gebildet und initiiert die zellver- mittelte und humorale Antwort. IFN- gamma fördert die Zytotoxizität der CD 8+- Zellen, den Isotypenswitch in B- Zellen für Komplement bindende Immunglobuline und die Bildung von Tumornekrosefaktor und Sauerstoffradikalen in Makrophagen.

3.4.4 Durchführung

Mit Hilfe eines Elispot- Testes ist es möglich durch einen enzymgebundenen Immunassay bestimmte von Zellen sezernierte Moleküle oder Stoffwechselprodukte nachzuweisen. Über eine Substratlösung ist es möglich diese Produktion bestimmter Moleküle als Farbpunkt optisch darzustellen.

Nachdem die Lymphozyten nach dem Schema in 3.2.1 aufgetrennt waren, konnte die weiße Fraktion der Lymphozyten in ein neues Reagenzröhrchen pipettiert werden. Die Lösung wurde nun mit RPMI 1640- Lösung bis auf 10 ml Gesamtlösung zum waschen der Zellen aufgefüllt. Es fand danach eine Zentrifugation für 5 Minuten bei 1800 g statt. Der Überstand an Nährmedium konnte bis auf 1 ml Suspension abgenommen werden. Die Zellen wurden resuspendiert und erneut bis auf 10 ml Lösung mit RPMI 1640 versetzt. Nach wiederholter Zentrifugation bei 1800 g für 5 Minuten konnte die Gesamtlösung erneut bis auf 1 ml reduziert werden. Nachdem die Lymphozyten wieder gelöst waren, konnte die Zellzahl mittels Neubauerzählkammer bestimmt werden. Entsprechend der gewünschten Zellzahl von 1,5 Millionen Zellen pro Milliliter Lösung wurde die Gesamtlösung durch Zugabe von Nährmedium hergestellt.

Anschließend wurde diese mit FKS versetzt. Der Anteil an FKS betrug auch hier 10 Prozent des Gesamtvolumens. Dabei war zu beachten, dass für diesen Test 3,6 ml Zellsuspension pro Proband notwendig waren. Dieses Volumen war nötig, da pro Patient ein Doppelansatz erstellt werden sollte und vier unterschiedliche Zusätze verwendet wurden. Hinzu kam, dass der Test mit vier unterschiedlichen Zytokinen erfolgte. Als Analysemedium diente eine bereits vorbeschichtete 96- Loch Mikrotiterplatte der Firma AID. Pro Loch wurden dabei 100 µl Zellsuspension verwendet. Je Proband wurden 32 Löcher der Platte verbraucht was eine minimale Gesamtlösung von 3,2 ml voraussetzte. Um Verluste durch die Pipettierung auszugleichen, wurde die Gesamtlösung auf minimal 3,6 ml aufgefüllt. Damit konnten Verluste bis maximal 12,5 µl pro Proband und Loch ausgeglichen werden. In dieser mindestens 3,6 ml umfassenden Zellsuspension mußten insgesamt rund 4,8 Millionen Lymphozyten vorhanden sein, da pro Loch ungefähr 150 000 Zellen für optimale Analysen nötig waren.

Die Mikrotiterplatte wurde durch die Firma AID mit vier unterschiedlichen Zytokinanti-

körpern beschichtet. Die Reihe 1,2 ,3 diente der Bestimmung von IFN- gamma. Reihe 4, 5, 6 war zur Analyse von IL- 4 angelegt. Um IL- 10 zu untersuchen wurde die Reihe 7, 8 und 9 genutzt. Die Reihe 10, 11, 12 diente der Bestimmung von IL- 13. Auf einer solchen Platte konnte Blut von maximal drei Probanden gleichzeitig untersucht werden. Die Zellsuspension des jeweiligen Patienten wurde mit Hilfe einer Multichannelpipette aufgetragen. Das verwendete Volumen betrug dabei 100 µl pro Loch. Anschließend konnten die Suspensionen mit Allergen und PHA versetzt werden. Dabei diente die Reihe A und E der nativen Probe des jeweiligen Patienten. Reihe B und F wurden 4 µl Wespengiftallergen pro Well hinzugefügt, was einer Konzentration von 2 ng Allergen entspricht. Bei Reihe C und G wurde ebenfalls Wespengiftallergen eingesetzt, allerdings mit einem Volumen von 20 µl. Dies ergibt eine Konzentration von 10 ng Allergen. Als Positivkontrolle wurde PHA mitgeführt. Es umfasste eine Menge von 1 µl pro Loch und wurde bei Reihe D und H angewendet. Die gesamte Bearbeitung der Zellkultur erfolgte unter sterilen Bedingungen. Im Anschluß daran wurde die Platte abgedeckt für 72 Stunden im CO₂ Brutschrank bei 37 °C inkubiert. Nach dieser Inkubation wurden die Zellsuspensionen mittels der Multichannelpipette von der Platte entfernt. Pro Spalte und Proband wurden die Pipettenspitzen gewechselt, um keine Durchmischung der Lösungen zu ermöglichen. Die Platte wurde mehreren Waschvorgängen unterzogen. Dafür wurden Waschlösungen entsprechend der Anleitung hergestellt. Waschpuffer 1 bestand aus PBS. Waschpuffer 2 enthielt PBS mit Tween. Beide Puffer wurden mit destilliertem Wasser verdünnt. Wichtig dabei war, dass die Mischung der Substanzen kurz vor dem Waschvorgang stattfand, alle kristallinen Bestandteile vollständig gelöst waren und die Substanzen vor Benutzung auf Zimmertemperatur gebracht wurden. Die Platte konnte nun zunächst dreimal mit dem Waschpuffer 1 gewaschen werden. Anschließend wurde die Platte mit der zweiten Waschlösung ebenfalls dreimal gewaschen. Zwischen jedem Waschschrift wurde die verbliebene Restmenge an Waschpuffer durch Abklopfen auf Papiertüchern von der Platte entfernt. Die Menge an Waschlösung betrug 200 µl pro Loch. Es wurden jetzt 10 ml VP (Verdünnungspuffer) mit 90 ml destilliertem Wasser gemischt. In 10 ml dieser Lösung wurden je 40 µl des biotinkonjugierten Nachweis- Antikörpers gelöst. Mittels Multichannelpipette wurden 100 µl dieser Antikörperlösung pro Loch aufgetragen. Im Anschluß fand eine 2,5 stündige Inkubation bei Raumtemperatur statt. Danach wurde die Platte viermal

Mit dem Waschpuffer 2 gewaschen. Die Platte konnte jetzt mit einer Streptavidin-HRP Lösung versetzt werden. Es wurden dabei 100 µl pro Loch eingesetzt. Streptavidin und HRP standen im Verhältnis 1:2000. Um diese Suspension herzustellen, wurden 10 µl Streptavidin- HRP mit 20 ml VP gemischt. Nach Auftrag dieser Lösung fand eine zweistündige Inkubation bei Raumtemperatur statt. Nach der Inkubation wurde die Platte nochmals dreimal mit dem Waschpuffer 2 gewaschen. Ein viermaliger Waschvorgang mit dem Waschpuffer 1 folgte. Die jeweiligen Volumina an Puffer betrugen 200 µl pro Loch. Während der Inkubation wurde eine Substratlösung hergestellt, welche aus 800 µl AEC und 24 ml Acetatpuffer bestand. Diese Lösung wurde anschließend mittels eines Sterilfilters der Porengröße 0,20 µm mehrmals gefiltert. Durch die Filterung kam es zu einer Entfärbung der vorher braunen Substratlösung, welche gewünscht war. Kurz vor dem Auftrag des Substrates zu 200 µl pro Loch wurden 12 µl Wasserstoffperoxid hinzugegeben. Nach 15 bis 70 Minuten wurde die Entwicklungsreaktion mit Hilfe von destilliertem Wasser gestoppt. Nachdem die Platte vollständig getrocknet war, konnte sie mit dem Elispot- Reader der Firma AID ausgewertet werden. Als Ergebnis erhält man die „spots“ per Well bzw. per eingesetzte Zellen. Die Software ermöglicht die variable Definition eines „spots“ bezüglich seiner minimalen oder maximalen Ausdehnung sowie seine Intensität.

3.5 Statistik

Zur Auswertung der am Durchflußzytometer erhobenen Daten diente die Berechnung des Mittelwertes, der Standardabweichung sowie des Standardfehlers. Eine statistische Signifikanz wurde mit Hilfe des t- Tests für unverbundene Stichproben überprüft. Als Signifikanzniveau galt $p < 0,05$. Die Darstellungen der Mittelwerte sowie der Standardfehler erfolgten in Form von Balkengrammen. Die Auswertung der Messergebnisse der Elispot- Tests erfolgte durch die Software der Firma AID.

3.6 Durchführung einer sublingualen Immuntherapie (SLIT)

Die Durchführung einer solchen SLIT soll hier am Beispiel von Sublivac, einem von der Firma HAL Allergie vertriebenem Therapeutikum vermittelt werden. Die in dieser Arbeit untersuchten Kindern unter SLIT wurden mit diesem Therapeutikum behandelt.

Nach sorgfältiger Diagnosestellung durch allergologisch ausgerichtete Anamnese und Diagnostik, kann Sublivac bei Symptomen wie allergischer Rhinitis, allergischer Konjunktivitis oder allergischem Asthma unter anderem verursacht durch Milben eingesetzt werden.

Die jeweilige Tagesdosis Sublivac wird unter die Zunge gebracht und für zwei bis drei Minuten, besser fünf Minuten dort belassen bevor sie verschluckt wird. Bei Kindern ist die Einnahme durch elterliche Aufsicht vorzunehmen.

Die Behandlung wird mit einer zu steigernden Anfangsbehandlung eingeleitet. Diese besteht aus der Flasche A und entspricht einer Allergendosis, wobei die Zieldosis dem Beginn der Dauerbehandlungsdosis (Flasche B) entspricht. Begonnen wird dabei mit einem Tropfen der niedrigsten Konzentration aus Flasche A. Es folgt dann eine allmähliche Dosis- und damit Konzentrationsteigerung.

Mittlerweile wird teilweise empfohlen, die Dosissteigerung bis zur Erhaltungsdosis innerhalb eines Tages durchzuführen.

Die klinische Praxis zeigt, dass es noch zahlreiche offene Fragen bezüglich optimaler Dosis und besonders den Standardisierungsoptionen bezüglich des Gehalts an Majorallergen gibt.

Die Abbildung 2 veranschaulicht ein solches Grundimmunisierungsschema bei dem mit einem Erreichen der Höchstdosis am zehnten Behandlungstag ein neueres Dosierungsschema vorliegt.

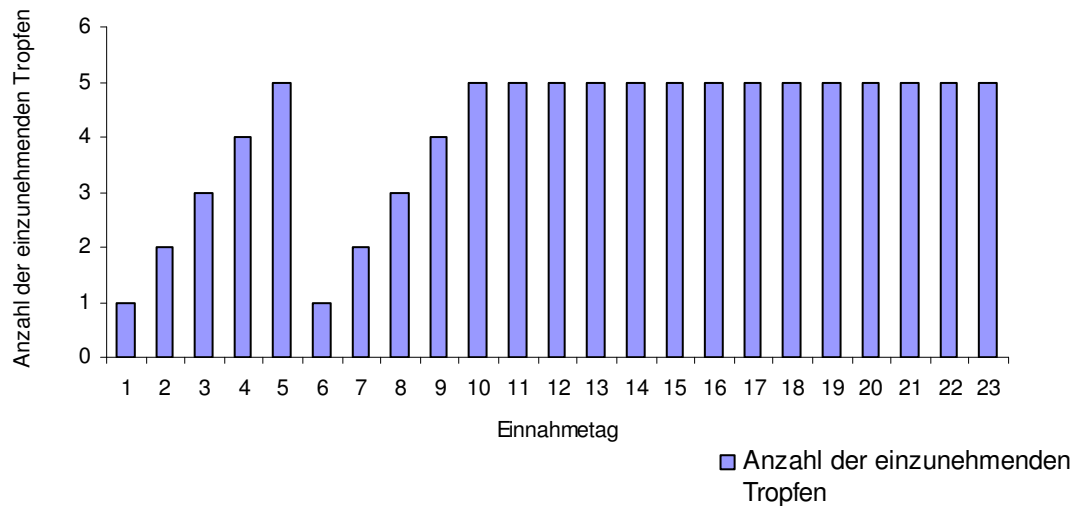


Abb.2: Dosierschema der Grundbehandlung mit Sublivac. Erster bis fünfter Tag Tropfen aus Flasche A. Ab sechsten Tag Tropfen aus Flasche B

Im unmittelbaren Anschluss an die Grundbehandlung erfolgt eine Fortsetzungsbehandlung mit täglicher Einnahme von 5 Tropfen aus Flasche B. Diese Dosierungsempfehlung stellt nur eine allgemeine Richtschnur dar. Der behandelnde Arzt kann, abweichend davon, auch andere Dosierungen empfehlen. Entscheidend ist immer die individuelle Verträglichkeit.

Die folgende Abbildung 3 stellt ein solches Fortsetzungsdosierschema dar.

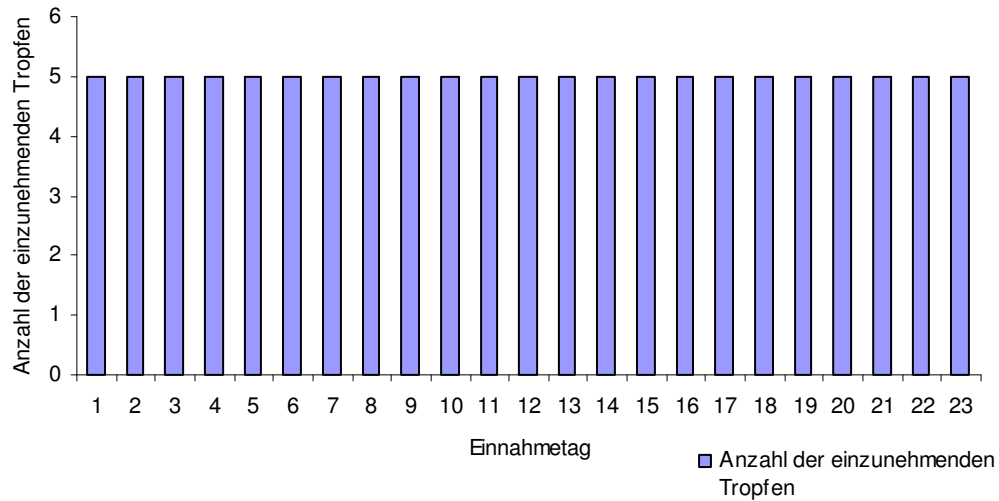


Abb.3: Dosierschema der Fortsetzungsbehandlung mit Sublivac. Alle Tropfen werden aus Flasche B eingenommen.

Zur Sicherung eines vollständigen und dauerhaften Therapieerfolges wird empfohlen die Therapie über einen Zeitraum von 3 bis 5 aufeinanderfolgenden Jahren durchzuführen.

4. ERGEBNISSE

4.1 Der Einfluss der Allergenkonzentration auf die Bildung von CD25 und CD69 durch T- und B- Zellen

In dieser Untersuchungsreihe sollten mögliche Veränderungen in der Expression von CD25 und CD69 unter Allergenstimulation erörtert werden. Dabei wurden Lympho – zytenkulturen Gesunder und Milbenallergiker unter gleichen Bedingungen untersucht. Eingesetzt wurden in aufsteigenden Mengen 0 µl, 10 µl, 100 µl sowie 1000 µl Milbenallergen.

Es zeigte sich beim Vergleich dieser Stimulationen durch Milbenallergen ein Anstieg der CD25 Produktion bei Allergikern durch B- Zellen von 3,06 % in der Probe ohne Stimulation auf 4,66 % bei 10 µl Allergen. Ein Maximum mit 7,34% CD25 positiver B- Zellen konnte beim Einsatz von 100 µl Milbenallergen ermittelt werden. Bei Gesunden konnte unter Milbenallergenstimulation ein Abfall der CD25 Expression von 8,28 % auf 5,23 % (10 µl), 5,25 % (100 µl) und 6,5 % bei 1000 µl Milbenallergen festgestellt werden.

Die Bildung von CD69 durch B- Zellen zeigte bei Allergikern unter aufsteigender Menge an Milbenallergen einen Anstieg von 3,74 % ohne Stimulanz auf 5,2 % (10 µl) und 9,84 % beim Einsatz von 100 µl Milbenallergen. Die Verwendung von 1000 µl Allergen erbrachte 4,46 % CD69 positiver B- Zellen. Bei gesunden Probanden konnte ein Abfall der CD69 Produktion von 9,72 % ohne Stimulation auf 7,64 % (10µl), 7,54 % (100µl) und 7,4 % unter Einsatz von 1000 µl Milbenallergen.

Die CD 25 Expression von T- Zellen zeigte bei Milbenallergikern einen Abfall der Expression von 2,24 % in der unstimulierten Probe auf 1,1 % in der mit 10 µl Allergen versetzten Zellkultur. Bei 100 µl eingesetztem Milbenallergen konnten 2,12 % positive T- Zellen ermittelt werden, während es unter 1000 µl Allergen bei Allergikern zu einem Abfall auf 1,28 % CD25 positiver T- Zellen kam. Gesunde Probanden wiesen unter Milbenallergenstimulation einen Anstieg von 0,13 %, ohne Stimulanz auf 0,25 % (10 µl), 0,58 % (100µl) sowie 1,58% unter 1000 µl verwendetem Allergen auf. Milbenallergiker und Gesunde zeigten bezüglich der Expression von CD69 durch ,T- Zellen die höchsten Expressionswerte in den Proben ohne Einsatz eines Stimulanz.

Der Einsatz des Milbenallergens von 10 µl erbrachte einen Abfall der CD69 Spiegel von 12,72 % auf 11,47 % bei Gesunden sowie von 31,67 % auf 7,28 % bei Milbenallergikern. Die CD69 positiven T- Zellen fielen bei 100 µl Allergen auf 10 % bei Gesunden und 5,3 % bei Allergikern ab. Beim Einsatz von 1000 µl Allergen konnten bei Gesunden 5,75 %, bei Allergikern 5,4 % CD69 positive T- Zellen festgestellt werden.

Da der Einsatz von 10 µl Allergen bereits einen Anstieg der Expression von CD25 und auch CD69 durch B- Zellen zeigte und die T- Zellen ihre höchste Expression unter Allergenzusatz ebenfalls bei 10 µl Allergen aufwiesen, wurde auf diese Menge Milbenallergen bei den Untersuchungen der beiden Allergikergruppen und den gesunden Probanden zurückgegriffen.

Diese Ergebnisse konnten durch weitere Versuche der Arbeitsgruppe bestätigt werden.

4.2 Die Induktion verschiedener Oberflächenmarker und Immunglobuline von unbehandelten Milbenallergikern unter Allergenstimulation

Bei dieser Untersuchung wurde auf mögliche Veränderungen der Expression von Oberflächenmolekülen und membrangebundenen Immunglobulinen unter Allergenstimulation bei Milbenallergikern vor einer sublingualen Immuntherapie untersucht. Die statistische Auswertung der Messdaten hinsichtlich der in der Durchflusszytometrie ermittelten Expressionsveränderungen erfolgte durch Berechnung der Mittelwerte, der Standardabweichung und des Standardfehlers sowie durch den t- Test . Als statistisch signifikant galt $p < 0,05$.

Die daraus resultierenden Ergebnisse werden im Folgenden für die T – Zellreihe sowie die B – Zellreihe getrennt dargestellt.

4.2.1 Der Vergleich von CD 71 , CD 69 , CD 54 und CD154 in der T – Zellreihe

Für die Expression von CD 71 in der nativen Probe und der Milbenallergenprobe konnte eine Erhöhung der mittleren Expression von 0,69 % auf 1,5 % festgestellt werden (n= 15). Dieses Ergebnis kann tendenziell gesehen werden ($p = 0,088$). Im

Vergleich der mit Milbenallergen stimulierten Probe und der mit Erle- bzw. Birkenallergen versetzten Probe zeigte sich ein Abfall von 1,5 % CD71 positiver T- Zellen in der Milbenallergenprobe auf 1,33 % in der Erle- bzw. Birkenprobe. Beim Vergleich des Nativansatzes mit der Erle- bzw. Birkenprobe ließ sich keine signifikante Differenz zwischen beiden Proben ermitteln, wenngleich es in der nativen Zellkultur 0,69 % und in der Erle- bzw. Birkenprobe 1,33 % CD71 positive T- Zellen gemessen wurden.

Bei Gegenüberstellung der gemessenen Werte für CD 69 ließ sich ein Anstieg der CD69 Expression von 2,32 % in der nativen Probe auf 3,65 % in der mit Milbenallergen versetzten Zellkultur feststellen. In der mit Erle- bzw. Birkenallergen stimulierten Probe konnten 3,5 % positive CD69 T- Zellen gemessen werden. Es ließ sich keine signifikante Differenz zwischen den Ansätzen beobachten.

Beim Vergleich der Expression von CD 54 durch T – Zellen konnte ein Anstieg von 1,31 % in der nativen Probe auf 3,67 % in der Milbenallergenprobe festgestellt werden. Es wurde signifikant mehr CD 54 in der mit Milbenallergen versetzten Probe gebildet als in dem nativ belassenen Ansatz. Der t- Test- Wert betrug hier $p= 0,035$. Die Messwerte wurden an 13 Patienten vor einer SLIT erhoben. Der Vergleich der CD54 Produktion der Milbenallergenprobe und des Erle- bzw. Birkenallergenansatzes, ergab eine signifikante niedrigere Expression an CD54 in der Erle- bzw. Birkenprobe ($p= 0,044$) errechnet werden. Zwischen den unstimulierten Proben und den mit Erle- bzw. Birkenallergen stimulierten Proben, ließ sich kein signifikanter Unterschied feststellen.

Bei Gegenüberstellung der CD154 Expression in den nativen Ansätzen und der mit Milbenallergen stimulierten Ansätze ließ sich ein Anstieg der CD154 Expression von 5,43 % (nativ) auf 8,62 % in der Milbenallergenprobe messen. Das Ergebnis kann mit $p= 0,084$ als tendenziell gewertet werden. Untersucht wurden dabei 12 Patienten vor einer SLIT. Der Vergleich der Milbenallergenprobe und der Erle- bzw. Birkenallergenprobe ergab einen Abfall von 8,62 % (Milbenallergenprobe) auf 5 % in der Erle- bzw. Birkenprobe ($p= 0,052$). Zwischen den nativen und mit Erle- bzw. Birkenallergen versetzten Proben wurde keine signifikante Differenz festgestellt.

Die Abbildung 4 veranschaulicht die ermittelten Messwerte der Durchflusszytometrie in Form von Mittelwertdarstellungen mit zugehörigem Standardfehler.

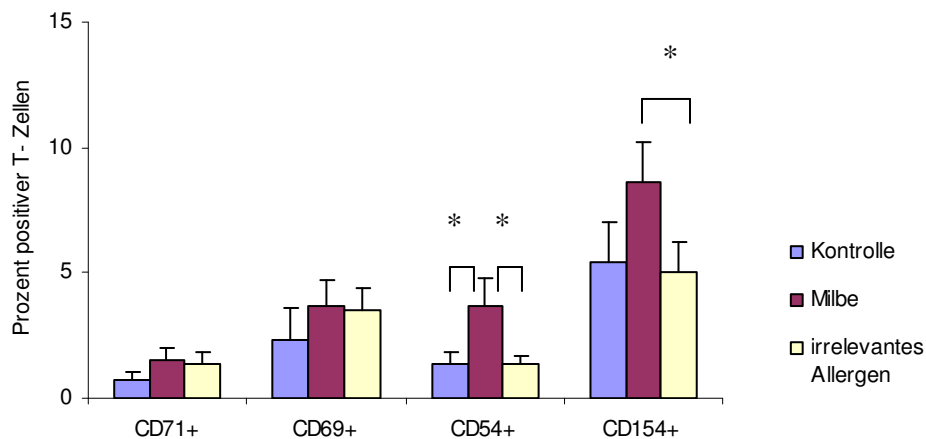


Abb.4: Mittlere Expression von CD71, CD69, CD54 sowie CD154 durch T- Zellen von Milbenallergikern vor einer SLIT unter Stimulation mit verschiedenen Allergenen. Die Fehlerbalken zeigen den Standardfehler. n= 9 bis 15 (n variiert wegen unterschiedlicher Verfügbarkeit der Antikörper und Allergene)
* = Signifikanz ($p < 0,05$)

4.2.2 Vergleich von CD71, CD69 sowie CD40 in der B– Zellreihe

Für die B– Zellreihe zeigte sich ein Anstieg der CD71 Expression von 2,65 % in der nativen Zellkultur auf 4,93 % in der Milbenallergenprobe ($p = 0,016$). Es wurden dabei $n = 15$ Milbenallergiker vor einer SLIT untersucht. Der Vergleich der beiden stimulierten Proben lieferte Messwerte von 4,93 % an CD71 positiven B- Zellen in der Milbenallergenprobe und 3,82 % CD71 positive B- Zellen in der Erle– bzw. Birkenprobe ($p = 0,145$). Es konnte zwischen nativer Zellkultur und Erlen- bzw. Birkenallergenansatz ein Anstieg von 2,65 % (nativer Ansatz) auf 3,82 % in der Erlen- bzw. Birkenallergenprobe ermittelt werden ($p = 0,092$).

Wie in der T– Zellreihe ließ sich auch für die Bildung von CD69 durch B- Zellen ein Anstieg der CD69 Expression von nativer Zellkultur zum Milbenallergenansatz feststellen. Fanden sich in der nativen Probe 9,83 % CD69 auf 12,25 % in der Milbenallergenzellkultur, wenngleich nicht signifikant ($p = 0,231$). Untersucht wurden Lymphozyten von insgesamt $n = 16$ Patienten. In der Erlen- bzw. Milbenallergenkultur

wurden 12,46 % CD69 positiver B- Zellen gemessen. Der Anstieg der Expression von Milbenallergenprobe zu Erlen- bzw. Birkenallergenansatz war nicht signifikant ($p= 0,474$). Auch zeigte der Anstieg der Expression von CD69 von nativer zu der mit Erlen- bzw. Birkenallergenprobe keine signifikante Differenz ($p= 0,217$).

Bei der Betrachtung der CD40 Messwerte zeigten sich in nativer Zellkultur 29,77 % und in der mit Milbenallergen versetzten Probe 30,03 % CD40 positive B- Zellen ($p= 0,480$). In der mit Erlen- bzw. Birkenallergenprobe zeigte sich mit 26,45 % CD40 positiver B- Zellen eine niedrigere Expression als in der Milbenallergenzellkultur ($p= 0,240$). Zwischen nativem Ansatz und Erlen- bzw. Birkenprobe konnte ein Anstieg der CD40 Expression von 3,32 % ermittelt werden ($p= 0,35$).

Das folgende Diagramm (Abb.5) stellt die Mittelwerte der erhobenen durchflusszytometrischen Daten dar. Ebenso dargestellt ist der jeweilige dazugehörige Standardfehler.

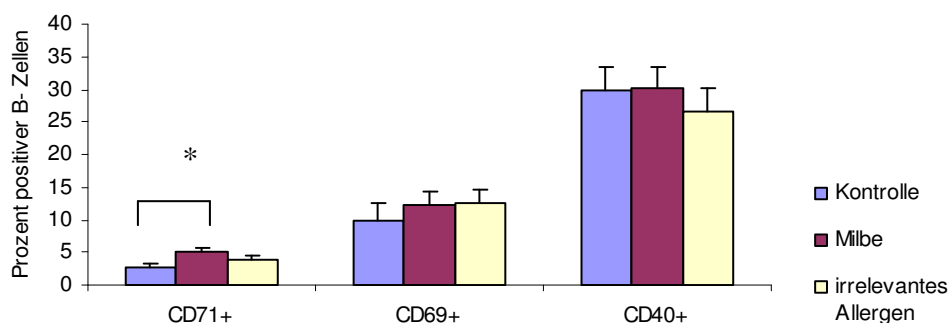


Abb. 5: Mittlere Expression von CD71, CD69 und CD40 durch B- Zellen von Milbenallergikern vor einer SLIT unter Stimulation mit verschiedenen Allergenen. Die Fehlerbalken zeigen den Standardfehler. $n= 13$ bis 16 (n variiert wegen unterschiedlicher Verfügbarkeit der Allergene und Antikörper). * = Signifikanz ($p< 0,05$)

4.2.3 Vergleich der Immunglobuline A, M und G in der B– Zellreihe

Für die Expression des Immunglobulin A zeigte sich ein Anstieg der Expression von nativer Zellkultur mit 5,31 % zur Milbenallergenprobe mit 5,59 % ($p= 0,212$). Untersucht wurden $n= 13$ Patienten. Zwischen der Zellkultur unter Milbenallergenstimu-

lation und der Erlen- bzw. Birkenallergenprobe konnte ein Abfall auf 5,43 % IgA positiver B- Zellen festgestellt werden ($p = 0,423$). Beim Vergleich der native Probe mit 5,31 % IgA positiven B- zellen und der Probe unter Erlen- bzw. Birkenallergenprobe mit 5,43 % ließ sich mit $p = 0,471$ keine signifikante Differenz ermittelt werden.

Bei Betrachtung der Bildung von IgM durch B- Zellen des nativen Ansatzes mit 16,06 % ergab sich im Vergleich der Milbenallergenprobe mit einem Anstieg auf 20,85 % ein tendenzieller Unterschied ($p = 0,094$). Bei Gegenüberstellung des unstimulierten Ansatzes und des Erlen- bzw. Birkenallergenansatzes zeigte sich ein Abfall von den 20,85 % IgM positiven B- Zellen auf 8,53 % ($p = 0,093$). Zwischen der nativen Zellkultur mit 16,06 % und der Erlen- bzw. birkenallergenprobe mit 8,53 % ließ sich ein Abfall der IgM positiven B- Zellen beobachten ($p = 0,166$). Es wurden hierbei Lymphozyten von insgesamt $n = 6$ Patienten untersucht.

Die Bildung von IgG wies mit 63,88 % in der nativen Zellkultur zu 69,64 % im Milbenallergenansatz einen Anstieg unter Stimulation auf ($p = 0,147$). Auch zeigte sich ein Anstieg der IgG Expression vom nativen Ansatz (63,88 %) zur Zellkultur unter Erlen- bzw. Birkenallergenstimulation mit 66,86 % ($p = 0,36$). Zwischen der Milbenallergenprobe mit 69,64 % und der mit Erlen- bzw. Birkenallergen versetzten Zellkultur mit 66,86 %, konnte ein Abfall der Expression verzeichnet werden ($p = 0,367$). Die durchflußzytometrischen Daten wurden dabei an 16 Patienten erhoben und ausgewertet.

Die Abbildung 6 zeigt die ermittelten Mittelwerte sowie Standardfehler in den unterschiedlich stimulierten Proben.

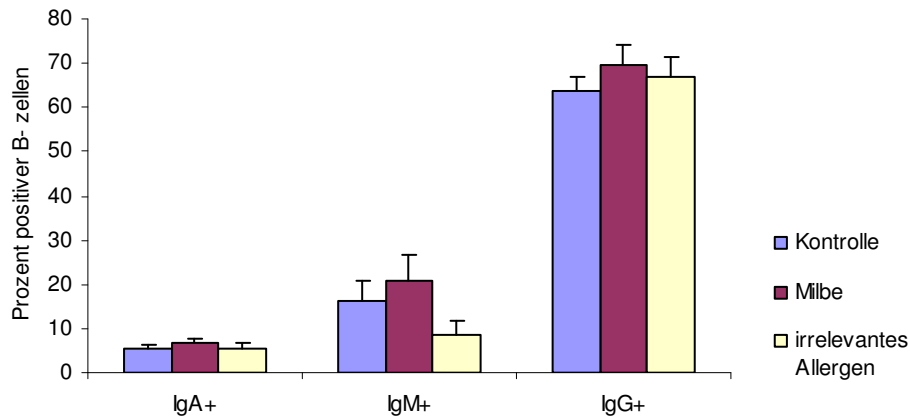


Abb. 6: Mittlere Expression von IgA, IgM und IgG durch B- Zellen von Milbenallergikern vor einer SLIT unter Stimulation verschiedener Allergene. Die Fehlerbalken zeigen den Standardfehler. n= 3 bis 17 (n variiert wegen unterschiedlicher Verfügbarkeit der Allergene und Antikörper; n= 3 bei IgM Bestimmung)

4.3 Der Vergleich verschiedener Oberflächenmarker und Immunglobuline von Milbenallergikern unter einer sublingualen Immuntherapie (SLIT)

Bei dieser Untersuchung sollte ermittelt werden, ob es unter einer sublingualen Immuntherapie zu Veränderungen in der Expression unterschiedlicher Oberflächenmoleküle und Immunglobuline durch T– und B– Zellen von Milbenallergikern kommt. Auch hierbei wurden verschieden stimulierte Proben untersucht. Mittelwert, Standardabweichung, Standardfehler sowie der t– Test sollten dabei mögliche signifikante Unterschiede aufzeigen. Als statistisch signifikant galt $p < 0,05$. Im Folgenden werden die Ergebnisse für die T– und die B– Zellreihe im Einzelnen dargestellt.

4.3.1 Vergleich von CD71, CD69, CD54 sowie CD154 in der T – Zellreihe

Die Expression von CD71 zeigte hinsichtlich des Vergleiches der jeweiligen Proben untereinander keine signifikanten Unterschiede. Es konnte ein leichter Abfall der Expression von CD71 in der Milbenallergenprobe im Vergleich zum nativen Ansatz festgestellt werden ($p=0,278$). Bei Betrachtung des nativen Ansatzes und des mit Erlen- bzw. Birkenallergen versetzten Ansatzes ergab sich eine geringe Steigerung der Expression von CD71 in der Probe mit Erlen- bzw. Birkenallergenstimulation ($p=0,252$). Die Expression von CD71 zeigte hinsichtlich des Vergleiches der jeweiligen Proben untereinander keine signifikanten Unterschiede. Untersucht wurden hier $n=7$ Patienten.

Bei Gegenüberstellung der erhobenen Messdaten für CD69 ließen sich für die erhobenen mittleren Expressionwerte nur geringe Schwankungen beim Vergleich der Proben miteinander feststellen. Dabei wurden Lymphozyten von $n=8$ Patienten untersucht.

Beim Vergleich der Expression von CD54 konnte ein geringfügiger Anstieg der Bildung von CD54 in der Milbenallergenkultur im Gegensatz zur unbehandelten Probe ermittelt werden ($p=0,402$). Vergleichend konnte ein leichter Anstieg der CD54 Expression im Erlen- bzw. Birkenallergenansatzes zum nativen Ansatz festgestellt werden ($p=0,316$). Die Untersuchung wurde an $n=8$ Patienten durchgeführt.

Die Betrachtung der CD 154 Messwerte zeigte sehr geringe Schwankungen bezüglich des Vergleichs der nativen und der Milbenallergenprobe ($p=0,404$). Zwischen nativen bzw. Milbenallergenansatz und der Erlen- bzw. Birkenprobe konnte ein leichter Anstieg der CD154 Expression ermittelt werden. Es traten hierbei innerhalb der Ansätze keine signifikanten Differenzen auf.

Im folgenden Diagramm (Abb. 7) sind die am Durchflusszytometer erhobenen Messdaten als Mittelwertdarstellungen mit zugehörigem Standardfehler abgebildet.

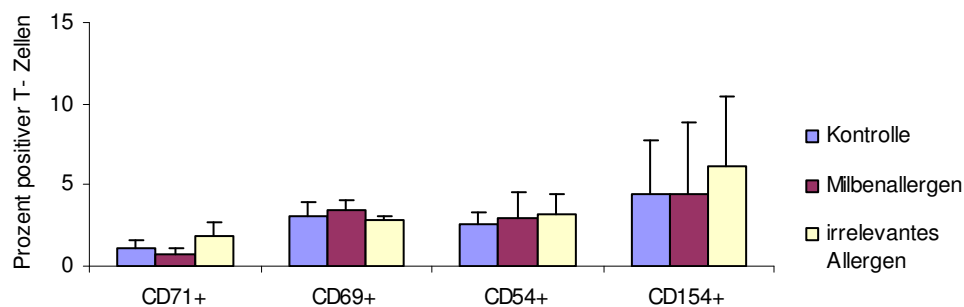


Abb. 7: Mittlere Expression von CD71, CD69, CD54 und CD154 durch T-Zellen von Milbenallergikern unter Stimulation mit verschiedenen Allergenen (Milbenallergen und Erlen- bzw. Birkenallergen) während einer SLIT. Die Fehlerbalken stellen den Standardfehler dar. n= 3 bis 9 (n variiert wegen unterschiedlicher Verfügbarkeit der Allergene und Antikörper; n=3 bei CD154 Bestimmung)

4.3.2 Vergleich von CD71, CD69 sowie CD40 in der B – Zellreihe

Bei einem Vergleich der unstimulierten Probe und des mit Milbenallergen versetzten Ansatzes konnte ein geringfügiger Anstieg der CD71 Expression in der Milbenallergenprobe ermittelt werden ($p=0,312$). Bei Betrachtung der Messwerte der Milbenallergenprobe und der mit Erlen- bzw. Birkenallergen stimulierten Probe konnte keine signifikante Veränderung der Expression von CD71 ermittelt werden. Dies konnte auch für den Vergleich native Probe und Erlen- bzw. Birkenallergenansatzes beobachtet werden.

Für die Expression von CD69 durch B– Zellen konnten zwischen nativer Probe und den stimulierten Zellkulturen nur leichte Veränderungen beobachtet werden. Untersucht wurden dabei n= 10 Patienten unter sublingualer Immuntherapie.

Die Bildung von CD40 zeigte einen Abfall in der Milbenallergenprobe im Vergleich zur Nativen ($p=0,317$). Die Gegenüberstellung der Milbenallergenprobe und des mit Erlen- bzw. Birkenallergen stimulierten Ansatzes zeigte eine etwas höhere Expression von CD40 im Erlen- bzw. Birkenallergenansatz ($p=0,251$). Es ließ sich beim Vergleich der Proben miteinander keine signifikante Differenz ermitteln.

Abbildung 8 stellt die Mittelwerte sowie die dazu gehörigen Standardfehler der unterschiedlich stimulierten Proben der Patienten unter einer sublingualen Immuntherapie dar.

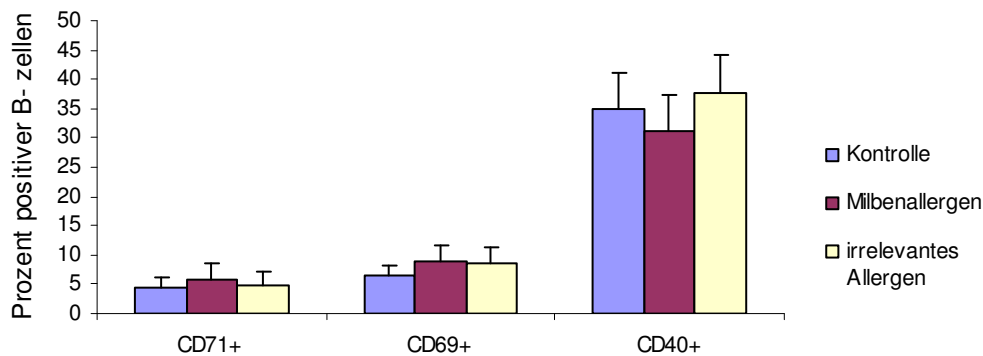


Abb. 8: Mittlere Expression von CD71, CD69 und CD40 durch B- Zellen von Milbenallergikern unter Stimulation mit verschiedenen Allergenen (Milbenallergen sowie Erlen- bzw. Birkenallergen) während einer SLIT. Der Fehlerbalken stellt den Standardfehler dar. $n=7$ bis 12 (n variiert wegen unterschiedlicher Verfügbarkeit der Allergene und Antikörper)

4.3.3 Vergleich der Immunglobuline A und G in der B– Zellreihe

Es ließ sich für die Bildung von IgA zwischen der Nativprobe und der mit Milbenallergen versetzten Probe eine geringfügige Absenkung der Expression in der Milbenallergenprobe feststellen ($p=0,205$). Ebenso zeigten sich keine signifikanten Unterschiede im Vergleich der stimulierten Proben untereinander.

Bei Betrachtung der ermittelten Immunglobulin G Werte zeigte sich ein Abfall der IgG Expression auf 64,15 % in der Milbenallergenprobe im Vergleich zum Nativansatz mit 74,91 % IgG positiver B- Zellen ($p= 0,086$). Die Milbenallergenprobe zeigte niedrigere IgG Werte als die Erle- bzw. Birkenprobe ($p= 0,200$). Untersucht wurden Zellkulturen von $n= 10$ bis 12 Patienten unter einer sublingualen Immuntherapie.

Das folgende Diagramm (Abb. 9) stellt die ermittelten Messdaten als Mittelwert und zugehörigem Standardfehler dar.

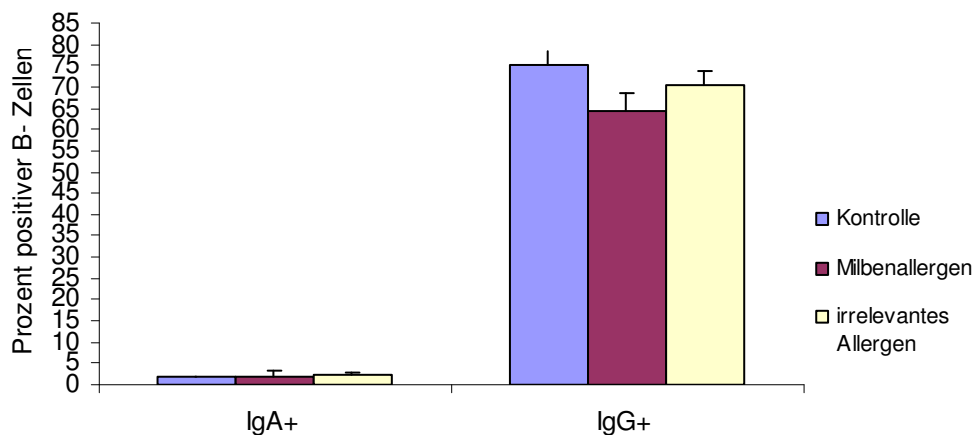


Abb. 9: Mittlere Expression von IgA und IgG durch B- Zellen von Milbenallergikern unter Stimulation mit verschiedenen Allergenen (Milbenallergen und Erle- bzw. Birkenallergen) während einer SLIT. Die Fehlerbalken stellen den Standardfehler dar. $n= 2$ bis 12 (n variiert wegen unterschiedlicher Verfügbarkeit der Allergene und Antikörper)

4.4 Der Vergleich verschiedener Oberflächenmarker und Immunglobuline gesunder Probanden unter Allergenstimulation

Die gesunden Probanden bildeten bei der Untersuchung eine Kontrollgruppe. Es sollte damit eine Vergleichsmöglichkeit zu den an einer Allergie erkrankten Probanden hergestellt werden. Zudem sollte außerdem untersucht werden, ob Proteine, gegen die häufig allergische Sensibilisierungen in der Bevölkerung bestehen, Lymphozyten grundsätzlich – also auch bei Gesunden- in ähnlicher Art zu

beeinflussen, wie z.B. durch die Fähigkeit, die Expression Allergie- relevanter Oberflächenmoleküle zu induzieren. Es wurden auch in dieser Gruppe Stimulationen mit Milben, - Erlen- und Birkenallergen durchgeführt. Hinzu kam eine Stimulation mit Katzenallergen. Durch diese Auswahl der Allergene wurden zusätzlich mögliche Unterschiede in der Expression der Oberflächenmoleküle und Immunglobuline innerhalb der Kontrollgruppe untersucht. Um mögliche Veränderungen in der Bildung dieser Moleküle und Immunglobuline festzustellen, wurde der Mittelwert der Einzelmesswerte, die Standardabweichung und der Standardfehler sowie der t- Test ermittelt. Die Ergebnisse werden auch hier nach B- und T- Zellreihe gesondert dargestellt.

4.4.1.1 Vergleich von CD71, CD69, CD54 sowie CD154 in nativer und stimulierter Zellkultur der T- Zellreihe

Bei Betrachtung der unstimulierten Zellkultur im Vergleich zur Katzenallergenprobe konnte ein geringfügiger Anstieg der Expression in dieser Allergenkultur beobachtet werden ($n= 10$; $p= 0,087$). Die Gegenüberstellung der unstimulierten Probe und des Erlenallergen- und Milbenallergenansatzes erbrachte leichte Unterschiede bezüglich der Produktion von CD71. Bei Betrachtung der nativen Zellkultur und der mit Birkenallergen versetzten Probe konnte ein t- Test- Wert von $p= 0,042$ errechnet werden.

Die CD 69 Expression der T- Zellen der unstimulierten Probe wies generell höhere Messwerte für CD 69 als die mit Allergenen stimulierten Proben auf. Die Veränderung der Bildung von CD 69 in der nativen Zellkultur und der mit Katzenallergen versetzten Probe besitzen tendenziellen Charakter ($p= 0,092$).

Für CD54 konnte eine höhere Expression in den mit Allergenen stimulierten Proben ermittelt werden. Eine signifikante Expressionssteigerung konnte in der mit Katzenallergen versetzten Probe mit 6,6 % im Vergleich zum nativen Ansatz mit 3,46 % ermittelt werden ($p= 0,024$).

Bei der Gegenüberstellung der nativen Probe zur der mit Erlen- und Birkenallergen angesetzten Zellkultur zeigten sich keine signifikanten Differenzen. Diese zeigten sich im Gegensatz zu unbehandelten Erkrankten auch nicht bei Stimulation mit

Milbenallergen. Es wurden dabei Lymphozytenkulturen von n= 10 Probanden getestet.

Auch für CD154 zeigte sich eine höhere Expression in den stimulierten Kulturen als im Nativansatz. In der mit Katzenallergen stimulierten Probe (9,47 %) konnte im Vergleich zum nativen Ansatz (4,2 %) eine signifikante Expressionssteigerung mit $p= 0,048$ festgestellt werden. Dies konnte ebenso für die mit Birkenallergen stimulierte Probe in Gegenüberstellung zur nativen Probe verzeichnet werden ($p= 0,016$). Bei Betrachtung des Erlen- und Milbenallergenansatzes zeigten sich zur unstimulierten Zellkultur keine signifikanten Unterschiede.

4.4.1.2 Vergleich von CD71, CD69, CD54 sowie CD154 nach Stimulation mit unterschiedlichen Allergenen in der T- Zellreihe

Beim Vergleich der mit verschiedenen Allergenen versetzten Ansätze miteinander, zeigten sich für die Expression von CD71 geringfügige Veränderungen.

Die Mittelwerte zeigten bei der mit Katzen- bzw. Milbenallergen versetzten Zellkultur im Vergleich zur Birkenallergenprobe eine niedrigere Produktion von CD71 an, allerdings ohne signifikante Differenz im t- Test.

Für die Bildung von CD69 und CD54 ließen sich nur leichte Schwankungen beim Vergleich der unterschiedlich stimulierten Ansätze ermitteln. CD154 zeigte dabei etwas mehr Veränderungen innerhalb der verschiedenen Allergene, aber dennoch ließen sich keine signifikanten Veränderungen bei Gegenüberstellung der verschieden stimulierten Proben ermitteln.

Der Vergleich der Allergenstimulationen miteinander erbrachte untereinander ähnliche t- Test- Werte. Im unten abgebildeten Diagramm (Abb. 10) sind die Mittelwerte der Messdaten in den verschiedenen Zellkulturen mit aufgetragenem Standardfehler dargestellt.

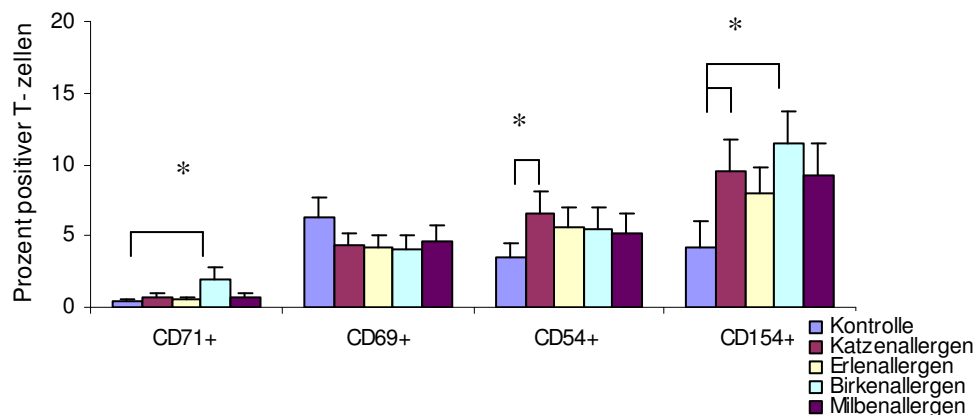


Abb. 10: Mittlere Expression von CD71, CD69, CD54 und CD154 durch T- Zellen gesunder Probanden unter Stimulation mit verschiedenen Allergenen (Katzen,- Erlen,- Birken- und Milbenallergen). Die Fehlerbalken stellen den Standardfehler dar. n= 7 bis 11 (n variiert wegen unterschiedlicher Verfügbarkeit der Allergene und Antikörper).

* = Signifikanz ($p < 0,05$)

4.4.2.1 Der Vergleich von CD71, CD69 und CD40 in nativer und stimulierter Kultur der B– Zellreihe

Die Bildung von CD71 in der nativen Probe zeigte leicht geringere Messwerte als unter Stimulation durch die verschiedenen Allergene. Der t- Test- Wert für den Vergleich native Zellkultur und Katzenallergenansatz betrug $p = 0,203$. Für den Vergleich nativer Ansatz und der mit Erlenallergen versetzten Probe ließ sich $p = 0,199$ ermitteln. Ein ähnlicher t- Test– Wert konnte für die Gegenüberstellung native Probe und Milbenallergenansatz festgestellt werden. Bei Betrachtung der mit Birkenallergen zeigte sich ebenfalls keine signifikante Differenz zwischen beiden Probe ($p = 0,447$).

Für die Bildung von CD69 im Nativansatz vergleichend zu den stimulierten Zellkulturen konnten nur kleine Schwankungen der Expression ermittelt werden. Dabei trat keine signifikante Differenz auf.

Bei Betrachtung der CD40 Bildung durch B– Zellen in nativer Kultur zeigte sich eine niedrigere Produktion von CD40 im Vergleich zu den stimulierten Zellkulturen.

Signifikante Differenzen ließen sich nicht feststellen.

4.4.2.2 Der Vergleich von CD71, CD69 und CD40 in mit unterschiedlichen Allergenen stimulierten Zellkulturen B– Zellreihe

Bei Betrachtung der Expression von CD71 in den unterschiedlich stimulierten Zellkulturen ließen sich nur sehr geringfügige Unterschiede ermitteln.

So lag beim Vergleich der Katzenallergenprobe und der Erlenallergenprobe der t-Test bei $p = 0,411$. Ähnliche Werte konnten für den Vergleich Erlenallergenansatz und Milbenallergenprobe sowie Katzenallergenprobe und Milbenallergenansatz ($p = 0,395$) errechnet werden. Beim Vergleich der mit Birkenallergenen stimulierten Proben und denen mit Katze, - Erle, - bzw. Milbenallergenen versetzten Zellkulturen konnten t- Test- Werte von $p = 0,254$, $p = 0,392$ sowie $p = 0,232$ erhoben werden.

Bei Gegenüberstellung der Mittelwerte für die Produktion von CD69, konnten keine wesentlichen Veränderungen in den verschiedenen stimulierten Zellkulturen festgestellt werden. Die t-Test– Werte lagen hier außerhalb des statistisch signifikanten Niveaus.

Die Betrachtung der im Durchflusszytometer erhobenen Messdaten für die Expression von CD40 lieferte einen Anstieg der Expression in denen mit Erlen,- Birken- und Milbenallergenen stimulierten Zellkulturen im Vergleich zum Katzenallergenansatz auf. Statistisch signifikante Unterschiede traten dabei nicht auf. Untersucht wurden dabei Lymphozytenkulturen von $n = 10$ Probanden.

Der Vergleich der mit Katzenallergenen versetzten Probe und der Erlen, - Birkenallergenprobe lieferte t- Test- Werte von $p = 0,308$ sowie $p = 0,201$. Der Vergleich Katzenallergenansatz und Milbenallergenprobe ergab $p = 0,253$. Bei Gegenüberstellung der mit Erlenallergenen stimulierten Zellkulturen und der Birken,- bzw.

Milbenallergenprobe konnten die t- Test- Werte $p = 0,235$ und $p = 0,411$ ermittelt werden. Die Betrachtung Birkenallergenansatz und Milbenallergenprobe lieferte mit $p = 0,421$ ebenfalls keine statistisch signifikante Veränderung.

Die Abbildung 11 stellt die in dieser Messreihe erhobenen Daten als Mittelwerte und Standardfehler dar.

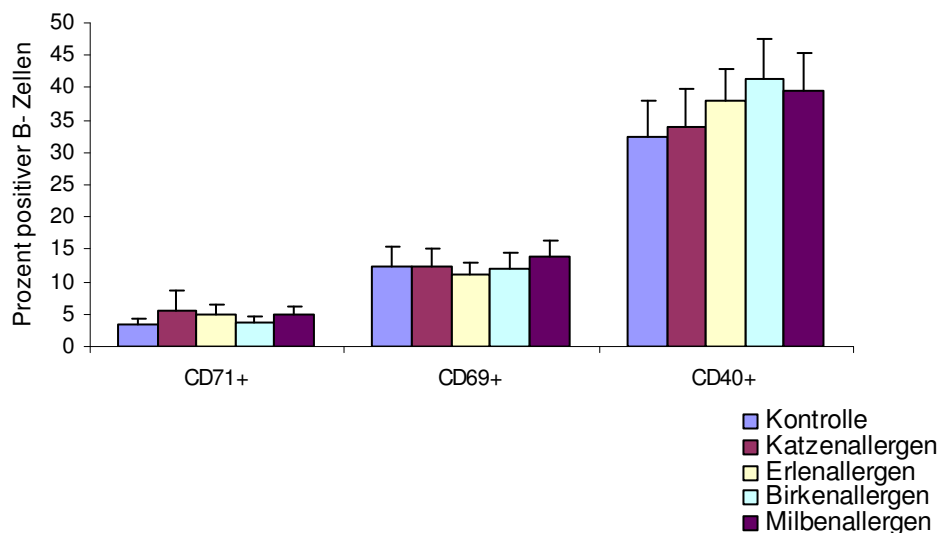


Abb. 10: Mittlere Expression von CD71, CD69 und CD40 durch B- Zellen gesunder Probanden unter Stimulation verschiedener Allergene (Katzen,- Erlen,- Birken- und Milbenallergen). Die Fehlerbalken stellen den Standardfehler dar. n= 5 bis 12 (n variiert wegen unterschiedlicher Verfügbarkeit der Allergene und Antikörper)

4.4.3.1 Vergleich Immunglobulin A, M und G in nativer und mit Allergen stimulierter Zellkultur der B– Zellreihe

Beim Vergleich der nativen Probe zu denen mit verschiedenen Allergenen versetzten Zellkulturen zeichnete sich ein Abfall der IgA positiven B- Zellen ab. Die ermittelten t- Test- Werte für den Vergleich nativ/ Katzenallergen sowie nativ/ Erlenallergen beliefen sich hier auf $p= 0,288$ und $p= 0,464$. Die Gegenüberstellung des nativen Ansatzes zur Birken- bzw. Milbenallergenprobe ergab Werte von $p= 0,131$ bzw. $p= 0,104$.

Eine Expressionsveränderung von IgM konnte beim Vergleich der nativen Proben zu denen mit Katzen- bzw. Erlenallergen versetzten Proben als leichter Abfall in den stimulierten Proben beobachtet werden. So betrug der t- Test- Wert für die native

Probe zur Katzenallergenprobe $p = 0,096$. Die Betrachtung der nativen Probe zur Erlen- bzw. Birkenallergenkultur lieferte t- Test- Werte von $p = 0,111$ bzw. $p = 0,395$. Für den Vergleich von Milbenallergenansatz und nativer Kultur konnte ein Anstieg von 10,15 % auf 11,22 % in der Milbenallergenprobe ermittelt werden ($p = 0,368$).

Die Vergleiche der nativen Zellkultur mit den stimulierten Proben zeigte relativ stabile Messwerte für die IgG positiven B- Zellen. Der Vergleich der nativen Zellkultur und den mit Katzenallergen versetzten Probe erbrachte einen t- Test- Wert von $p = 0,454$. Ähnliches Werte mit $p = 0,446$, $p = 0,341$ sowie $p = 0,387$ konnten für den Vergleich native Zellkultur zu Erlen, Birken- und Milbenallergenansatz festgestellt werden.

4.4.3.2 Vergleich Immunglobulin A , M und G stimulierter Zellkulturen in der B – Zellreihe

Für die IgA– Spiegel ließen sich beim Vergleich der stimulierten Proben miteinander leichte Expressionsveränderungen darstellen, wenngleich nicht signifikant.

Bei Betrachtung des Immunglobulin M– Spiegels ließen sich tendenzielle Veränderungen ermitteln. Diese traten beim Vergleich der mit Katzenallergen versetzten Probe zur Birkenallergenprobe auf ($p = 0,086$). Ebenso konnte beim Vergleich des Katzenallergenansatzes und der mit Milbenallergen stimulierten Probe ein t- Test- Wert von $p = 0,055$ festgestellt werden. Auch zeigte sich diese tendenzielle Veränderung in der Bildung von IgM beim Vergleich der Erlenallergenprobe und der mit Milbenallergen versetzten Zellkultur ($p = 0,066$). Bei Betrachtung der Katzenallergenprobe und des Erlenallergenansatzes ließ sich keine statistische Relevanz in der IgM Produktion feststellen ($p = 0,483$). Der Vergleich der Erlenallergenkultur und des mit Birkenallergen stimulierten Ansatzes ($p = 0,108$) sowie des Birkenallergenansatzes und der mit Milbenallergen stimulierten Probe lieferte mit von $p = 0,255$ keine signifikanten Differenzen.

Die Vergleiche der Expression von IgG durch B- Zellen in den unterschiedlich stimulierten Lymphozytenkulturen lieferten geringfügige Veränderungen. Die ermittelten t- Test- Werte lagen über dem Signifikanzniveau von $p < 0,05$. Es wurden in dieser Untersuchungsreihe von $n = 11$ Gesunden Lymphozyten untersucht.

Das folgende Diagramm (Abb. 11) zeigt die berechneten Mittelwerte und Standardfehler.

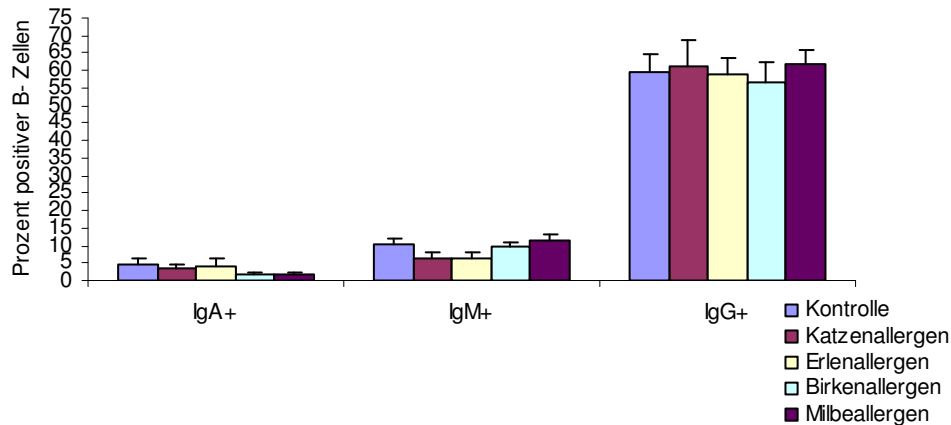


Abb. 11: Mittlere Expression von IgA, IgM und IgG durch B- Zellen von gesunden Probanden unter Stimulation mit verschiedenen Allergenen (Katzen,- Erlen,- Birken- und Milbenallergen). Die Fehlerbalken stellen den Standardfehler dar. n= 3 bis 12 (n variiert wegen unterschiedlicher Verfügbarkeit der Allergene und Antikörper; n= 3 bei IgM Bestimmung)

4.5 Der Vergleich verschiedener Oberflächenmarker und Immunglobuline unstimulierter Lymphozyten von Milbenallergikern vor und unter einer SLIT sowie Gesunden

Eine Gegenüberstellung der unstimulierten Zellkulturen der beiden Milbenallergiker-Gruppen (unverbundene Stichprobe) und der gesunden Probanden sollte eventuelle Expressionsunterschiede von Oberflächenmolekülen und Immunglobulinen aufzeigen. Dabei wurde nach möglichen Veränderungen in der Produktion solcher Moleküle gesucht, welche auch ohne vorherige Stimulation durch ein Allergen vorhanden sind.

Um solche möglichen Unterschiede zu erkennen, wurde der Mittelwert, die Standardabweichung und der Standardfehler berechnet. Eine statistische Signifikanz konnte

durch den t- Test für unverbundene Stichproben ermittelt werden. Das Signifikanzniveau betrug $p < 0,05$.

Im Folgenden werden die Ergebnisse nach T- und B- Zellreihe getrennt dargestellt und als Mittelwertdarstellungen in Diagrammen abgebildet.

4.5.1 Vergleich von CD71, CD69, CD54 sowie CD154 durch T- Zellen unstimulierter Zellkulturen

Bei Betrachtung der CD71 Expression zwischen der nativen Probe der unbehandelten Milbenallergiker und der Milbenallergiker unter einer SLIT ließ sich ein leicht erhöhter CD71 Wert messen ($p = 0,228$) ermitteln. Beim Vergleich der Patienten vor einer Immuntherapie und Gesunden konnte nur ein leichter Unterschied ($p = 0,225$) festgestellt werden. Der Vergleich gesunder Probanden mit Patienten nach einer sublingualen Immuntherapie zeigte einen Anstieg von 0,39 % bei Gesunden zu 1,11 % CD71 positiver T- Zellen bei Patienten unter SLIT ($p = 0,058$).

Die Produktion von CD69 in Zellkulturen von Milbenallergikern vor und unter Therapie wies nur geringe Schwankungen auf ($p = 0,317$). Bei Gegenüberstellung der Patienten vor einer SLIT und gesunden Probanden konnte ein Abfall der Expression von 6,64 % bei Gesunden auf 2,32 % bei Milbenallergikern vor SLIT, mit $p = 0,016$ festgestellt werden. Ebenso konnten äquivalente Veränderungen beim Vergleich der Gesunden mit den Milbenallergikern nach einer SLIT erkannt werden ($p = 0,039$).

Die Expression des Zelladhäsionsmoleküls CD54 im nativen Ansatz der Milbenallergiker vor SLIT zeigte mit 1,31 % niedrigere Werte als bei der Allergikergruppe unter SLIT (2,54 %), ($p = 0,099$). Der Vergleich der Allergiker vor einer Therapie und Gesunden zeigte mit $p = 0,036$ eine signifikante mittlere Mehrproduktion von CD54 durch T- Zellen gesunder Probanden. Die Gegenüberstellung der gesunden Probanden und der Milbenallergiker nach einer SLIT erbrachte mit $p = 0,253$ keine signifikante Änderung in der Produktion von CD54.

Bei Betrachtung der CD154 Expression in den unstimulierten Proben der drei Untersuchungsgruppen konnten nur geringe Schwankungen beim Vergleich der Gruppen festgestellt werden. Der t- Test lag über dem Signifikanzniveau von $p < 0,05$.

Im unten stehenden Diagramm (Abb. 12) sind die Messwerte als Mittelwerte und Standardfehler dargestellt.

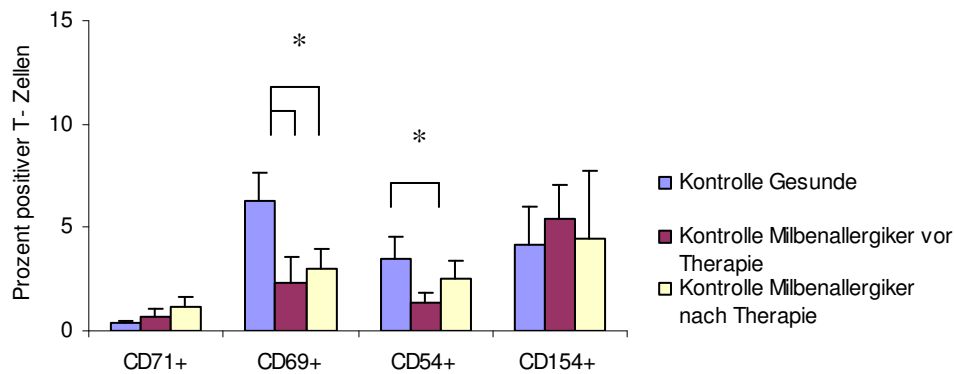


Abb. 12: Mittlere Expression von CD71, CD69, CD54 und CD154 durch T- Zellen unstimulierter Proben von Milbenallergikern vor und unter SLIT sowie gesunden Probanden. Die Fehlerbalken stellen die Standardfehler dar. n= 4 bis 15 (n variiert wegen unterschiedlicher Verfügbarkeit der Allergene und Antikörper).
* = Signifikanz ($p < 0,05$)

4.5.2 Vergleich von CD71, CD69 und CD40 durch B- Zellen unstimulierter Zellkulturen

Bei der Expression von CD71 durch B- Zellen ließen sich geringe Schwankungen zwischen den einzelnen Gruppen feststellen. Beim Vergleich der beiden Milbenallergikergruppen zeigte sich ein Abfall der Expression von Patienten vor einer SLIT und Patienten nach SLIT. Gleiches zeigte zwischen Patienten vor SLIT und Gesunden ($p = 0,217$). Ähnliches ließ sich für den Vergleich Gesunde und Allergiker unter einer SLIT beobachten.

In den Zellkulturen der Milbenallergiker konnte ein Abfall der Expression von CD69 bei Milbenallergikern vor und unter SLIT im Vergleich zu Gesunden verzeichnet werden. Beim Vergleich der Milbenallergiker vor einer Immuntherapie und den Gesunden konnte mit $p = 0,267$ keine Signifikanz in der Differenz aufgezeigt werden. In den nativen Proben der Milbenallergiker nach SLIT wurde mit $p = 0,048$ signifikant weniger CD69 produziert als bei gesunden Probanden.

Die CD40 Expression der B- Zellen zeigte bei gesunden Probanden höhere CD40 Messwerte als bei Milbenallergikern vor einer SLIT ($p= 0,331$) und niedrigere Messwerte zur Patientengruppe unter SLIT ($p= 0,369$). Die Betrachtung der Milbenallergikergruppen miteinander, ergab höhere CD40 Spiegel bei Patienten unter SLIT ($p= 0,199$).

In der Abbildung 13 werden diese Ergebnisse in Form von Mittelwerten und Standardfehlern dargestellt.

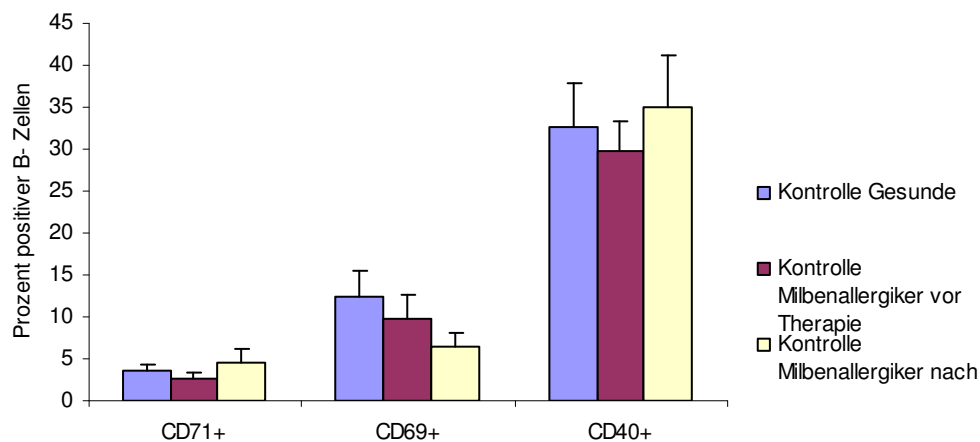


Abb. 13: Mittlere Expression von CD71, CD69 und CD40 durch B- Zellen unstimulierter Proben von Milbenallergikern vor und während einer SLIT sowie gesunden Probanden. Die Fehlerbalken stellen den Standardfehler dar. $n= 7$ bis 16 (n variiert wegen unterschiedlicher Verfügbarkeit von Allergenen und Antikörpern)

4.5.3 Vergleich IgA, IgM und IgG durch B- Zellen unstimulierter Zellkulturen

Die Bildung von IgA durch B- Zellen in den nativen Ansätzen der beiden Milbenallergikergruppen wies einen leichten Anstieg bei Milbenallergikern vor Therapie zu Patienten unter Therapie auf ($p= 0,131$) auf.

Beim Vergleich der Milbenallergiker welche noch keiner Immuntherapie zugeführt wurden und den gesunden Probanden konnte eine höhere Expression bei Milbenallergikern vor Therapie festgestellt werden ($p= 0,349$). Die Betrachtung der

Gesunden und der Allergiker nach einer SLIT erbrachte keine signifikanten Expressionsveränderungen ($p=0,199$).

Der Vergleich der IgM Produktion in den nativen Proben der Gesunden und der Allergiepatienten vor einer SLIT zeigte höhere IgM Spiegel bei Patienten vor einer SLIT ($p=0,429$).

In den nativen Zellkulturen der Patienten nach einer SLIT stieg der IgG- Spiegel von 59,7 % bei Gesunden auf 63,88 % bei Patienten vor einer SLIT ($p=0,229$) und 74,91 % bei Milbenallergikern unter einer SLIT an. Mit $p=0,017$ war hier ein signifikanter Anstieg der Expression von IgG im Vergleich der Patienten vor einer SLIT zu Patienten unter einer SLIT erkennbar. Dies ließ sich auch für den Vergleich Gesunde und Patienten nach einer SLIT feststellen. Hier betrug $p=0,011$.

Das folgende Diagramm (Abb. 14) veranschaulicht diese Ergebnisse als Mittelwertdarstellungen und aufgetragenem Standardfehler.

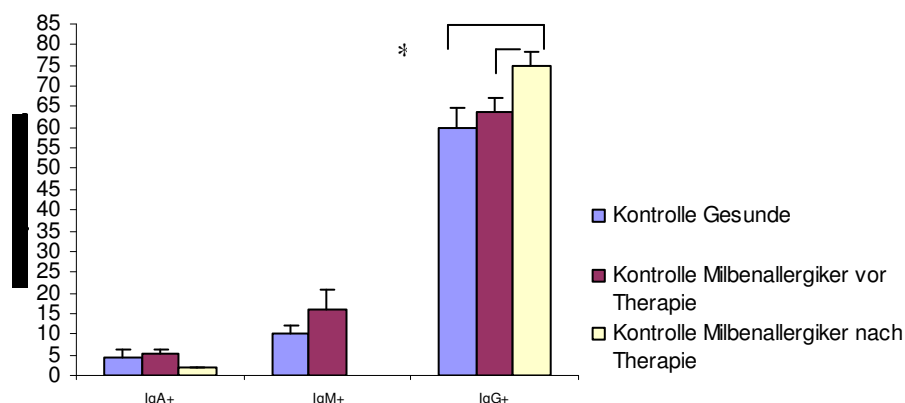


Abb. 14: Mittlere Expression von IgA, IgM und IgG durch B- Zellen unstimulierter Proben von Milbenallergikern vor und unter SLIT sowie gesunden Probanden. Die Fehlerbalken stellen die Standardfehler dar. $n=2$ bis 17 (n variiert wegen unterschiedlicher Verfügbarkeit der Allergene und Antikörper). * = Signifikanz ($p<0,05$)

4.6 Der Vergleich der Expression von CD- Antigenen und Immunglobulinen bei Milbenallergikern vor und unter SLIT sowie gesunden Probanden unter Milbenallergenstimulation

Bei dieser Gegenüberstellung der drei Untersuchungsgruppen sollten eventuell auftretende Veränderungen in der Expression von verschiedenen Oberflächmolekülen und Immunglobulinen aufgezeigt werden. Dabei wurden nur die Ansätze

miteinander verglichen, die zuvor mit Milbenallergen stimuliert wurden. Aus den erhobenen Messdaten am Durchflusszytometer wurden der Mittelwert und die Standardabweichung sowie der Standardfehler gebildet. Als statistisch signifikant wurde im t- Test das Signifikanzniveau $p < 0,05$ angenommen. Im Folgenden werden diese Ergebnisse nach T- und B- Zellkultur getrennt dargestellt.

4.6.1 Vergleich CD71, CD69, CD54 sowie CD154 in der T- Zellreihe

Bei Betrachtung der Expression von CD71 in der stimulierten Zellkultur der Patienten vor einer SLIT zu den Patienten nach einer SLIT ließ sich ein ca. um die Hälfte niedriger CD71 Spiegel bei Allergikern unter Therapie feststellen ($p = 0,184$). Beim Vergleich der Milbenallergenprobe der Patienten vor einer Therapie und Gesunden konnte zeigt sich ein ähnliches Bild ($p = 0,117$). Die Werte der Gesunden und Patienten unter SLIT ähnelten sich.

Beim Vergleich der Bildung von CD69 konnte zwischen den beiden Allergikergruppen nur eine sehr geringe Veränderung feststellen ($p = 0,433$). Es wurde für die Gegenüberstellung der Patienten vor einer Therapie und den gesunden Probanden ein leicht höherer Spiegel von CD69 positiven T- Zellen ermittelt ($p = 0,274$). Die Betrachtung der Patientengruppe nach Therapie und gesunden Probanden erbrachte keine signifikanten Unterschiede.

Die Vergleiche der Gruppen in Bezug auf die Bildung von CD54 ergab eine geringere Expression von CD54 bei Milbenallergikern vor einer SLIT bei den Gesunden ($p = 0,200$). Beim Vergleich der Milbenallergiker nach einer SLIT und Gesunden zeigten sich ähnliche Unterschiede ($p = 0,163$).

Die Produktion von CD154 lag bei Gesunden leicht über den Messwerten von Patienten vor und deutlich, aber nicht signifikant, über denen von Patienten unter SLIT. Milbenallergiker vor einer SLIT produzierten im Mittel mehr CD154 als Milbenallergiker unter SLIT ($p = 0,239$). Aufgrund der relativ hohen Standardabweichung war dieser Unterschied aber nicht signifikant. Zwischen Gesunden und Milbenallergikern zeigten sich keine signifikanten Differenzen in der mittleren CD154 Expression.

Die Abbildung 15 enthält die erhobenen Mittelwerte und deren Standardfehler.

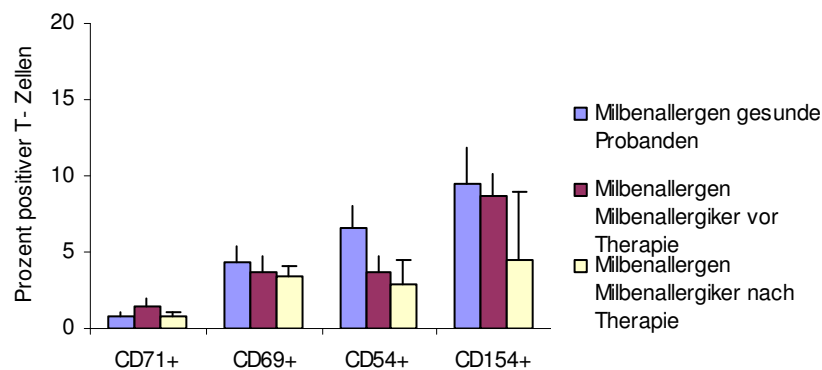


Abb. 15: Mittlere Expression von CD71, CD69, CD54 und CD154 durch T- Zellen von Milbenallergikern vor und unter SLIT sowie gesunden Probanden unter Milbenallergenstimulation. Der Fehlerbalken stellt den Standardfehler dar. n= 3 bis 15 (n variiert wegen unterschiedlicher Verfügbarkeit von Allergenen und Antikörpern)

4.6.2 Der Vergleich von CD71, CD69 sowie CD40 durch B- Zellen

Der Vergleich der Bildung von CD71 bei Milbenallergikern vor und nach einer Immuntherapie zeigte sich ein geringfügiger Anstieg von CD71 bei Patienten unter Therapie ($p= 0,310$). Die Betrachtung der Patientengruppe vor bzw. nach einer SLIT und Gesunden lieferte bezüglich der Mittelwerte aller drei Gruppen nur wenige Veränderungen.

Die Betrachtung der Mittelwerte der drei Untersuchungsgruppen zeigte geringfügige Veränderungen in der Expression von CD69. Patienten vor einer SLIT produzierten 12,2 % CD positiver B- Zellen, während Patienten unter SLIT 9,0 % bildeten ($p= 0,175$). Der Vergleich der Milbenallergiker die noch keine SLIT erhalten haben und Gesunden zeigte mit 8,44 % bei Patienten unter SLIT zu 13,83 % bei Gesunden

einen niedrigeren CD69 Spiegel ($p = 0,325$). Mit $p = 0,104$ konnte zwischen Patienten nach spezifischer Immuntherapie und Gesunden keine Signifikanz gezeigt werden.

Die Bildung von CD40 durch B- Zellen stimulierter Zellkulturen ließ beim Vergleich der Allergiker vor und nach Therapie kein Unterschied der Expression bei Patienten unter Therapie erkennen ($p = 0,426$). Bei Gegenüberstellung der an einer Milbenallergie erkrankten Patienten und Gesunden konnte mit $p = 0,071$ eine tendenziell geringere Produktion von CD40 bei diesen Allergikern ermittelt werden. Zwischen Patienten nach einer SLIT und der gesunden Gruppe konnten nur geringfügige Veränderungen ermittelt werden.

Das folgende Diagramm (Abb. 16) stellt diese Ergebnisse als Mittelwerte und Standardfehler dar.

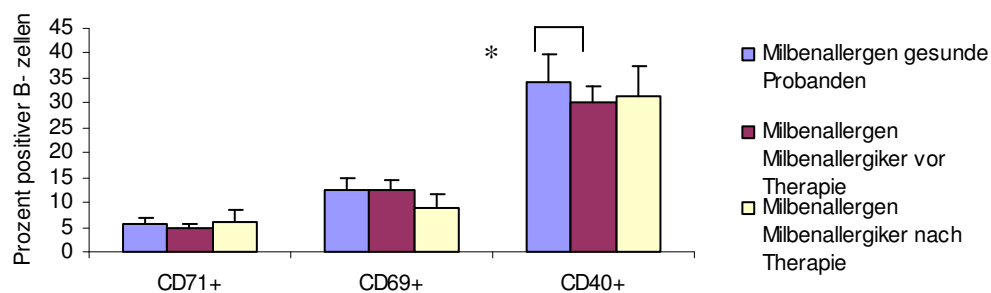


Abb. 16: Mittlere Expression von CD71, CD69 und CD40 durch B- Zellen von Milbenallergikern vor und unter SLIT sowie gesunden Probanden unter Milbenallergenstimulation. Die Fehlerbalken Stellen den Standardfehler dar. $n = 7$ bis 16 (n variiert wegen unterschiedlicher Verfügbarkeit von Allergenen und Antikörpern).

* = Signifikanz ($p < 0,05$)

4.6.3 Der Vergleich von IgA, IgM und IgG durch B-Zellen

Beim Vergleich der Bildung von IgA in den beiden Patientengruppen, konnte mit $p = 0,067$ eine tendenzieller Anstieg der IgA Spiegel bei Patienten vor einer Therapie zu Patienten nach Therapie festgestellt werden. Bei Milbenallergikern vor einer Immuntherapie zeigte sich mit $p = 0,021$ ein signifikant höherer IgA- Spiegel als bei gesunden Probanden. Solch eine Signifikanz konnte zwischen den Patienten nach einer SLIT und Gesunden nicht ermittelt werden.

Der IgM- Spiegel zeigte zwischen den Patienten vor Therapie und den Gesunden leicht höhere Werte bei Milbenallergikern vor einer SLIT ($p = 0,102$).

Bei Betrachtung der IgG Produktion konnte zwischen den beiden Milbenallergikergruppen ein etwas erniedrigter IgG Wert bei Patienten unter Therapie ermittelt werden. Dies konnte ebenso für den Vergleich von Gesunden und Allergikern vor einer SLIT festgestellt werden. Die IgG- Spiegel der Patienten nach Therapie lieferten keine signifikanten Unterschiede zu dem der Gesunden.

Die am Durchflußzytometer erhobenen Messwerte werden als Mittelwert und Standardfehler im folgenden Diagramm (Abb. 17) repräsentiert.

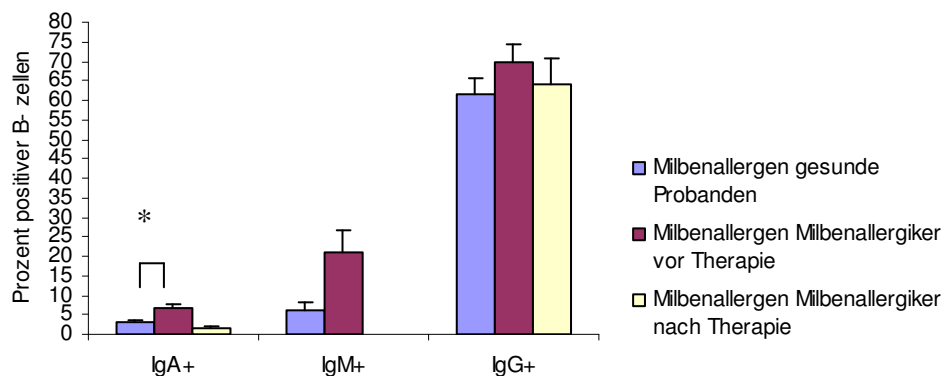


Abb. 17: Mittlere Expression von IgA, IgM und IgG durch B- zellen von Milbenallergikern vor und während einer SLIT sowie gesunden Probanden unter Milbenallergenstimulation. Die Fehlerbalken stellen den Standardfehler dar. $n = 2$ bis 17 (n variiert wegen unterschiedlicher Verfügbarkeit der Allergene und Antikörper; $n = 2$ bei IgM Bestimmung). * = Signifikanz ($p < 0,05$)

4.7 Der Vergleich der Differenzen aus nativer Zellkultur zum Milbenallergenansatz

Hierbei wurde die Differenz der mit Milbenallergen stimulierten Zellkultur und deren nativen Ansätzen gebildet. Dies wurde sowohl für die Allergikergruppen als auch für die Gruppe der gesunden Probanden erstellt. Mit diesen Werten wurde dann die statistische Signifikanz mittels t- Test überprüft. Damit sollte ein eventueller Anstieg oder Abfall der Expression von CD Antigenen und Immunglobulinen von nativer zu stimulierter Zellkultur aufgezeigt und mögliche Unterschiede darin der verschiedenen Untersuchungsgruppen festgestellt werden.

4.7.1 Vergleich der Milbenallergiker vor sowie unter SLIT

Zunächst wurden diese Differenzen der beiden Allergikergruppen miteinander verglichen. Für die Expression von CD71 durch B- und T- Zellen konnte mit $p=0,224$ bzw. $p=0,253$ keine Signifikanz ermittelt werden. Bei Betrachtung der CD69 Produktion ließ sowohl in der T- Zellreihe als auch in der B- Zellkultur keine signifikante Veränderung feststellen.

Beim Vergleich der Expressionsveränderung von nativer zu stimulierter Probe in beiden Patientengruppen konnte mit $p=0,068$ ein tendenzieller Unterschied in der Bildung von CD54 durch T- Zellen ermittelt werden. Bei Patienten war der Anstieg der Expression des CD54 von nativer zu stimulierter zellkultur signifikant größer. Für die CD154 Produktion lieferte der t- Test keine signifikanten Veränderungen zwischen den Allergikergruppen.

Die IgA- Spiegel wiesen beim Vergleich beider Patientengruppen keine statistisch signifikanten Unterschiede auf. Bei Betrachtung der IgG- Spiegel fiel mit $p=0,053$ eine tendenzielle Expressionssteigerung bei Patienten unter SLIT auf.

4.7.2 Vergleich der Milbenallergiker vor einer SLIT und gesunden Probanden

Bei Betrachtung der CD71 Expression von nativer zu der mit Milbenallergen versetzten Proben beider Gruppen lieferte sowohl für die T- Zell als auch für die B- Zellreihe keine statistischen Signifikanzen.

Der Vergleich der CD69 Spiegel beider Gruppen erbrachte mit $p = 0,075$ eine tendenzielle Veränderung in der T- Zellreihe. Dies konnte für die B- Zellreihe nicht festgestellt werden.

Die CD54 Expression zeigte beim Vergleich der Differenzen keine signifikanten Unterschiede zwischen beiden Untersuchungsgruppen.

Mit $p = 0,131$ konnte für die Produktion von CD154 das Signifikanzniveau von $p < 0,05$ nicht erreicht werden.

Die Gegenüberstellung der Differenzen der IgA Messwerte erbrachte keine Signifikanz. Dies konnte für die IgM Spiegel ebenfalls festgestellt werden. Beim Vergleich der IgG Bildung durch die B- Zellen ließ sich keine statistisch signifikante Veränderung erkennen.

4.7.3 Vergleich der Milbenallergiker nach einer SLIT und gesunden Probanden

Bei Betrachtung der Differenzen konnte für die Expression von CD71 weder in der T- Zellreihe noch in der B- Zellreihe ein signifikanter Unterschied festgestellt werden. Die CD69 Produktion zeigte keine statistische Signifikanz beim Vergleich der Allergiker nach einer SLIT und Gesunden. Dies konnte für beide Zellreihen gezeigt werden.

Beim Vergleich der Produktion von CD54 ließ sich das Signifikanzniveau von $p < 0,05$ nicht erreichen.

Die Gegenüberstellung der beiden Untersuchungsgruppen bezüglich der Expression von CD154 erbrachte mit $p = 0,071$ einen tendenziellen Unterschied.

Das Vergleichen der Differenzen der IgA- Spiegel zeigte keine signifikanten Veränderungen. Bei der Produktion von IgG ergab sich mit $p = 0,029$ ein statistisch signifikanter Unterschied der Differenzen beider Gruppen.

4.8 IFN- gamma, IL-4, IL- 10 und IL- 13 bei Wespengiftallergikern vor und unter subkutaner Immuntherapie sowie gesunden Probanden

Beim Vergleich der IFN- gamma Produktion durch Lymphozyten zeigte sich bei 6 von 8 Patienten ein Anstieg der IFN- gamma Bildung unter SCIT. Bei 2 Patienten zeigten sich nur geringe Schwankungen. Gesunde Probanden bildeten mehr IFN- gamma als Patienten vor Therapie, aber weniger als die gleichen Patienten unter SCIT.

Bei 4 von 8 Patienten konnte ein Anstieg der IL- 4 Produktion unter SCIT im Elispot-Test festgestellt werden. Bei 2 Patienten konnte ein Absinken der IL- 4 Bildung durch Lymphozyten während der SCIT ermittelt werden. Die gesunden Probanden wiesen eine geringere IL- 4 Bildung als die Wespengiftallergiker auf.

Die IL- 10 Expression zeigte bei 5 Patienten einen Anstieg unter SCIT, während sie bei 3 Patienten sank bzw. unverändert blieb. Die gesunde Kontrollgruppe lieferte bezüglich der IL- 10 Bildung schwankende Ergebnisse.

Bei 5 von 8 Patienten vor einer SCIT zeigte sich eine verringerte Produktion von IL- 13 unter subkutaner Immuntherapie. Bei 3 Patienten konnte ein Anstieg der IL- 13 Bildung unter Therapie ermittelt werden. Für die gesunden Probanden konnte eine niedrigere Produktion von IL- 13 als bei den Wespengiftallergikern festgestellt werden.

4.9 Zusammenfassung der wichtigsten Ergebnisse

Für die FACS- Untersuchung lies sich bei Patienten vor einer SLIT eine signifikant höhere mittlere Expression von CD71 durch B- Zellen und CD54 durch T- Zellen in der mit Milbenallergen stimulierten Kultur im Vergleich zur nativen Zellkultur ermitteln. Gesunde Probanden bildeten signifikant mehr CD154 in der mit Katzen bzw. Birkenallergen stimulierten Zellkultur als in Nativkultur.

Gesunde Probanden bildeten signifikant mehr CD69 als Milbenallergiker. Zudem exprimierten sie mehr CD54 als Patienten vor Therapie. Patienten nach Therapie zeigten signifikant höhere IgG- Spiegel als Gesunde und Patienten vor einer SLIT.

5 DISKUSSION

Die spezifische Immuntherapie mit Allergenen ist neben der Allergenkenz die einzige kausale Therapieoption IgE- vermittelter allergischer Erkrankungen.

Zahlreiche kontrollierte Studien dokumentieren die Wirksamkeit der spezifischen Immuntherapie zum Teil mit evidenzbasierten Kriterien Grad Ia und Grad Ib. (Abramson M et al. 1999, Abramson et al. 2000, Ross RN et al. 2000, Ross RN et al. 2000, Bousquet J et al. 1998) So ist es möglich durch eine spezifische Immuntherapie einen positiven Einfluss auf bronchiale Symptome zu nehmen und den Bedarf an antiasthmatischer Medikation zu reduzieren. (Bousquet J et al. 1991, Bousquet J et al. 1989)

Diese Therapieform kann nachgewiesenermaßen die Entwicklung einer allergischen Rhinokonjunktivitis hin zum Asthma bronchiale verhindern. (Jacobson L 2001, Möller C et al. 2002) Die Zahl, Aktivität und Verteilung von Effektorzellen, Mastzellen und eosinophilen Granulozyten werden durch eine spezifische Immuntherapie ebenfalls beeinflusst. So konnten verminderte Zahlen von Eosinophilen in der Haut, in der Nase und den Bronchien nach SIT gemessen werden. (Durham SR und Till SJ 1998) Immuntherapie bei Gräserallergikern zeigt sich in einer Verminderung der Histaminfreisetzung und Mastzellmediatoren nach Provokation. (Durham SR und Till SJ 1998, Durham SR et al. 1999, Bousquet J et al. 1991, Furin MJ et al. 1991)

Trotz dieser durch Studien belegter Erfolge einer spezifischen Immuntherapie ist deren Wirkmechanismus noch nicht vollständig nachvollziehbar.

Unter einer spezifischen Immuntherapie kommt es relativ rasch zu einem Anstieg von IgG Antikörpern gegen die verwendeten Allergene. Dies führte auch zum ersten immunologischen Erklärungsansatz zur Wirksamkeit, den „blockierenden“ IgG Antikörpern. (Creticos PS et al. 1984) Vermittelt über eine Reihe von Mechanismen, wie die Stimulation von hemmenden IgG- Rezeptoren, wird der Induktion von allergenspezifischen IgG heute weiterhin Bedeutung beigemessen. (Daeron M 1997) Von zentraler Bedeutung für das Verständnis der immunologischen Wirkungsweise wird heute das Modell der TH1/ TH2 – Imbalance und deren Veränderung unter einer spezifischen Immuntherapie gesehen.

Die Entwicklung einer naiven Th – Zelle, die auf ein von einer dendritischen Zelle präsentiertes Peptid reagiert, hängt von verschiedenen Faktoren ab. Abhängig von

den Cytokinen, denen die Th0 – Zelle vor und während dieser Reaktion ausgesetzt war, sowie den spezifischen Eigenschaften des Antigens, der Allergendosis und des Präsentationsweges findet die Prägung zur TH1 oder TH2- Zelle statt. Ebenso spielt auch die Dauer des Vorgangs eine Rolle. (Rogers PR und Croft M 1999)

In Verbindung zum vorliegenden Zytokinmuster erfolgt die Einteilung in TH1- Zellen, welche vordergründig IFN- gamma und IL- 2 bilden, und den TH2- Zellen die IL -4, IL -5, IL -9, IL-10 und IL- 13 sowie TGF– beta sezernieren. (Romagnani S et al. 1997, Janeway CA et al. 2002) Dabei konnte gezeigt werden, dass bei Erstkontakt mit einem Allergen nicht atopische Personen eine Prägung der TH0- Zellen in Richtung TH1, bei Allergikern hingegen in Richtung TH2 stattfindet. (Wierenga EA et al. 1990, Parronchi P et al. 1991)

In verschiedenen Geweben der Atopiker ließ sich durch eine vermehrte Expression von IL- 4 und IL-5 ein Überwiegen der TH2- Zellen nachweisen. (Durham SR et al. 1992, Robinson DS et al. 1992, Gaga M et al. 1991, Varney VA et al. 1992)

Eine weitere relativ wahrscheinliche Möglichkeit der Differenzierung zu TH2- Zellen ist in den antigenpräsentierenden Zellen zu sehen. Ihre Expression von IL- 6 induziert die Bildung von TH2- Zellen aus naiven T- Zellen. (Van Snick 1990, Maggi E et al 1989)

Im allgemeinen geht man heute davon aus das die SIT einen Einfluss auf diese TH1/ TH2- Imbalance ausübt. Durch die spezifische Immuntherapie konnte eine Um - orientierung der Polarisation der T- Helfer- Zell- Antwort von TH2 in Richtung TH1 beschrieben werden. Wobei allerdings in unterschiedlichen Untersuchungen und experimentellen Systemen etwas unterschiedliche Ergebnisse erzielt wurden. (Ebner C et al. 1997, Jutel M et al. 1995, Secrist H et al 1993, Fireman P 1996)

Von zentraler Bedeutung dürfte weiterhin insbesondere die Induktion einer immunologischen Toleranz gegen die verwendeten Allergene sein. So konnten Bellinghausen et al zeigen, dass es zu einer allergenspezifischen Hemmung der T- Zell- Antwort kommt, welche eng mit der Induktion der IL- 10 Produktion verknüpft ist. Die Blockade führt zu einer weitgehenden Wiederherstellung der T- Zell- Antwort. (Bellinghausen I et al 1997)

Als ein wesentliches Erfolgskriterium der SIT wird eine verminderte Expression von IL- 4, welche ursächlich auf den Switch von TH2 nach TH1 zugeführt wird, angesehen. Die Verminderung der IL- 4 Sekretion und der Anstieg der IFN- gamma

Freisetzung als abgeleitete Vorstellung des TH1- Th2 Modells konnte durch Studien von McHugh et al, Akoum et al sowie Jutel et al am besten gezeigt werden.(Jutel M et al 1995, McHugh SM et al. 1995, Akoum H et al. 1996) Die in dieser Arbeit durch Elispottests untersuchte Gruppe von Wespengiftallergikern gibt Hinweise darauf, dass die IL-10 Produktion und die IFN- gamma Expression unter SCIT steigt.

Inwieweit es möglicherweise noch andere Veränderungen der Zellaktivität von T- und B- Zellen vor und im Verlauf einer Immuntherapie gibt, war Inhalt dieser Arbeit.

Die zu untersuchenden CD- Oberflächenrezeptoren und membrangebundenen Immunglobuline sollten zum einen bezüglich eventueller Unterschiede bei Milbenpatienten vor und unter sublingualer Immuntherapie betrachtet werden. Zum anderen war es die Aufgabe daraus zu ermitteln, ob bestimmte gemessene Parameter einen Anhaltspunkt liefern, der zur Verlaufskontrolle einer sublingualen Immuntherapie herangezogen werden könnte. Die Untersuchung der gesunden Gruppe diente nicht nur dem Vergleich zu den beiden Milbenallergikergruppen, sondern hier stellte sich die Frage inwieweit und ob Allergene in der Lage sind auch beim Gesunden ausgewählte molekulare Parameter zu beeinflussen.

5.1 Oberflächenmoleküle und membrangebundene Immunglobuline auf B- und T- Zellen von Milbenallergikern vor und unter SLIT

5.1.1 Der Transferrin- Rezeptor CD71

Das als allgemeiner Proliferationsfaktor geltende Transferrin- Rezeptor CD71 wurde von Poryadin et al hinsichtlich seines Verhaltens in unterschiedlichen Stadien eines atopischen Asthma bronchiale untersucht und zeigte in allen Stadien signifikant höhere CD71 Spiegel. Diese Studie konnte ebenso eine sowohl größere Anzahl B- Zellen in unterschiedlichen Differenzierungsstadien als auch aktivierter B- Zellen ermitteln. (Poryadin GV et al. 2002)

Ähnliche Ergebnisse bezüglich CD71 zeigten sich auch in dieser Arbeit. So ließ sich bei Milbenallergikern besonders vor einer SLIT eine gesteigerte mittlere Expression von CD71 durch T- und B- Zellen ermitteln. Konnte bei Betrachtung der T- Zell-

Population ein tendenzieller Anstieg von CD71 unter Milbenallergenstimulation festgestellt werden, so war er in der B- Zellkultur signifikant. Für eine Veränderung der Bildung von CD71 unter SLIT spricht die in dieser Arbeit ermittelte um die Hälfte niedrigere mittlere Expression dieses Moleküls durch Milbenallergen stimulierte T- Zellen von therapierten Patienten. Dieser Verlauf zeigte sich jedoch nicht in der B- Zellpopulation. Es ließ sich feststellen, dass bei Patienten nach Therapie generell höhere mittlere Messwerte von CD71 durch T- und B- Zellen in der nativen Kultur sowie nach Stimulation mit irrelevanten Allergenen (Erlen –bzw. Birkenallergen) auftraten als bei Patienten vor einer SLIT.

Zusammengefasst deutet die hier beobachtete verminderte Expression von CD71 unter SLIT eine verminderte Proliferation der mit Allergen spezifisch stimulierten Zellen hin. Diese Änderung kann als Zeichen einer teilweisen Immuntoleranz gegenüber dem Allergen interpretiert werden.

5.1.2 Das Aktivierungsmolekül CD69

Julius et al konnten in ihrer Studie zeigen, dass es in Abhängigkeit des Allergens zu einer gesteigerten Expression von CD69 durch Eosinophile kam. (Julius P et al 1999)

In einer Untersuchung von Hartnell et al konnte gezeigt werden, dass die Expression von CD69 durch Eosinophile mittels IL- 5 gesteigert werden kann. (Hartnell A et al.1993)

Ein Interleukin, welches in Geweben von Atopikern vermehrt exprimiert wird. (Durham SR et al. 1992, Robinson DS et al 1992, Gaga M et al. 1991, Varney VA et al. 1992)

Huang et al untersuchten CD69 bezüglich seines Verhaltens unter spezifischer Immuntherapie. Sie beschäftigten sich dabei aber nicht mit dem Verhalten der Eosinophilen sondern der T- Lymphozyten. Die Bestimmung der CD69 Spiegel erfolgte mittels Durchflußzytometrie und ELISA. Es konnte dabei gezeigt werden, dass bei Patienten mit guter Ansprechbarkeit auf eine spezifische Immuntherapie die Expression von CD69 gesenkt werden konnte. (Huang JL et al. 2002)

Die Ergebnisse dieser Arbeit boten in der T- Zellreihe bei Patienten nach einer SLIT in denen mit relevantem (Milbenallergen) sowie mit irrelevantem (Erlen- bzw. Birkenallergen) Allergen stimulierten Proben niedrigere mittlere Expressionswerte von CD69 als Milbenallergiker vor einer SLIT. Während sich bei Milbenallergikern

eine Stimulation mit Milbenallergen in einer Expressionsteigerung zur nativen Probe zeigte, fanden sich bei Patienten nach einer Therapie nur wenige Schwankungen. Zudem ließ sich in der B- Zellreihe zeigen, dass es nach einer Immuntherapie zu einer generell niedrigeren mittleren Produktion von CD69 unabhängig vom Stimulus kommt, ähnlich der T- Zellreihe. Zeigte sich auch beim Vergleich der Gruppen untereinander und gruppeninternen Gegenüberstellungen keine statistische Signifikanz, so gibt es doch Hinweise auf Expressionsveränderungen von CD69 unter einer sublingualen Immuntherapie. Die generelle Verminderung der Expression des Lymphozytenaktivierungsmarkers CD69 unter SLIT kann eine verminderte unterschwellige Entzündungsreaktion des Patienten widerspiegeln.

5.1.3 Das Molekülsystem CD40 / CD154 (CD40 Ligand)

Einen für die T- und B- Zellkooperation wichtigen Molekülkomplex, stellt das CD40 auf B- Zellen und sein Ligand CD154 auf T- Zellen dar. Diese beiden Moleküle sind für den Isotypenswitch zu IgE von entscheidender Bedeutung und tragen so maßgeblich zur klinischen Symptomatik einer allergischen Erkrankung bei. Cagnoni et al konnten in ihrer Studie zeigen, dass es durch Stimulation von Epithelzellen des Respirationstraktes mit IFN- gamma zu einer Zunahme der Expression von CD40 kommt. (Cagnoni F et al. 2004)

Ippoliti et al führten Untersuchungen an einer Milbenallergie erkrankten Kindern vor und unter einer SLIT durch. Sie konnten die Theorie des Einflusses einer solchen Therapie auf die TH1- TH2- Imbalance unterstützen und auch einen Abfall der Asthma- und Rhinitissymptome feststellen. Allerdings zeigten sich in dieser Studie keine Veränderungen bezüglich der Expression von CD40 durch B- Zellen. (Ippoliti F et al. 2003)

In dieser Arbeit ergab die Untersuchung der CD40 Expression bei Milbenallergikern vor Therapie ein ausgeglichenes Bild beim Vergleich der beiden stimulierten Proben und des nativen Ansatzes. Bei Patienten nach Therapie zeigte sich jedoch ein Anstieg der mittleren Expression von CD40 generell, aber vor allem in der nativen Probe und im Ansatz mit den irrelevanten Allergenen Erle- bzw. Birke. Es stellt sich nun die Frage, ob es durch den in verschiedenen Studien beschriebenen Anstieg von

IFN- gamma unter einer Immuntherapie zu einer Mehrproduktion von CD40 wie sie von Cagnoni et al publiziert wurde sich auch hier zeigte.

Garmendia et al zeigten, dass es bei Patienten mit chronisch idiopathischer Urtikaria eine höhere Expression löslichen CD154 gibt und im Aktivierungsprozess der Immunreaktion eine Rolle spielt. (Garmendia JV et al. 2004) Es konnte gezeigt werden, dass es sowohl bei Milbenallergikern als auch bei Grasspollenallergikern zu einem Anstieg des CD154 unter unspezifischer Stimulation kommt. (Markert UR et al. 1999) Bei den Messungen des CD154 in dieser Arbeit ergaben sich für die Milbenallergiker vor einer Therapie die höchsten mittleren Werte für CD154 unter Milbenallergenstimulation und tendenziell niedrigere Werte in der nativen Zellkultur und der Erlen- bzw. Birkenallergenkultur. Diese Unterschiede zeigten sich dagegen bei Patienten unter einer sublingualen Immuntherapie nicht. Es ist zu vermuten, dass es unter SLIT zwar zu einer Produktion von CD154 kommt, diese womöglich aber nicht mehr so stark abhängig von der Art des stimulierenden Allergens ist und der IgE- Klassen-switch damit vermindert wird. Dies könnte zu der verbesserten Symptomatik der Patienten unter Therapie beitragen.

5.1.4 Das Zelladhäsionsmolekül CD54

Ein bei Allergien gut untersuchtes Zelladhäsionsmolekül ist CD54 (ICAM-1). CD54 fördert das Eindringen von Lymphozyten in ein Entzündungsgebiet und wird dort, aber auch systemisch bei entzündlichen Erkrankungen vermehrt exprimiert.

Ähnliches gilt für seine lösliche Isoform sICAM- 1. Atsuta et al konnten in Abhängigkeit der Zytokinaktivität eine Induktion der CD54 Expression im Bronchialepithel aufzeigen. (Atsuta J et al. 1997) Stanciu und Djukanovic beobachten, dass es einen Anstieg der CD54 Expression beim Asthma bronchiale gibt. (Stanciu LA und Djukanovic R 1998) Ein Abfallen der CD54 Expression durch periphere natürliche Killerzellen (PB NK) konnte bei Kindern im Zustand einer akuten Asthma Exazerbation im Gegensatz zu Kindern in einer stabilen Phase des Asthma bronchiale durch Lin et al beobachtet werden. Sie vermuteten, dass dies entweder an einer Selektion der PB NK welche CD54 bilden und in das entzündete Lungengewebe wandern liegt oder an einer Vermehrung an NK- Zellen die kein CD54 bilden während der akuten Exazerbation des kindlichen Asthmas. (Lin SJ et al. 2003) Grzelewska- Rzymowska und Pietrzkowicz

konnten eine höhere Expression von CD54 durch Endothel- und Epithelzellen bei Patienten mit einer Rhinitis feststellen. Zusätzlich ließ sich bei diesen Patienten die lösliche Form des CD54 Antigens, sICAM- 1 in bronchoalveolärer und nasaler Lavage sowie im peripheren Blut nachweisen. (Grzelewska- Rzymowska und Pietrzkowicz 2004)

Es gibt verschiedene Studien, welche eine Abnahme der CD54 Expression unter einer Immuntherapie belegen. Palma-Carlos et al konnten eine statistische Senkung des sVCAM- 1 Spiegels nach spezifischer Immuntherapie nachweisen. Ein Absinken der sICAM-1 Spiegels ließ sich feststellen, wenngleich nicht signifikant. (Palma-Carlos AG et al. 2001)

Eine ebenfalls an Milbenallergikern durchgeführte Untersuchung erbrachte eine signifikante Senkung von CD54 durch Zellen des Nasenepithels nach Behandlung mit einer sublingualen Immuntherapie. (Silvestri M et al. 2002) Huang et al konnten bei ihrer durchflußzytometrischen Untersuchung von T- Lymphozyten allergischer Kinder nach einer spezifischen Immuntherapie ebenfalls einen Abfall der CD54 Bildung durch T- Zellen feststellen.(Huang JL et al. 2002) Diese Ergebnisse konnten in einer weiteren Arbeit bestätigt werden. (Reich M et al 2003) Ähnliche Ergebnisse erhielten auch Roever et al in ihrer Untersuchung an Wespenallergikern, welcher sich einer Ultra- rush- Immuntherapie unterzogen. (Roever AC et al. 2002)

Die in dieser Arbeit erhobenen Messwerte für die CD54 Expression zeigten bei Milbenallergikern vor einer SLIT einen signifikanten Anstieg der Expression unter Milbenallergenstimulation im Vergleich zur nativen Probe und der Probe mit Erlen- bzw. Birkenallergenversatz. Bei Milbenallergikern nach Therapie zeigten die mittleren Messwerte für CD54 dagegen nur leichte Schwankungen zwischen den einzelnen Ansätzen. Durch den Vergleich der Differenzen aus Milbenallergenprobe und nativem Ansatz bei beiden Patientengruppen konnte dieses Ergebnis bestätigt werden. Auffallend war, dass zwar bei Patienten unter Therapie in der nativen Probe und der irrelevanten Allergene (Erle- bzw. Birke) prozentual mehr CD54 durch die T- Zellen exprimiert wurde als bei Patienten vor einer SLIT, aber bei Betrachtung der Milbenallergenprobe ein niedrigerer CD54 Spiegel bei Patienten nach Therapie vorlag. Dieses Ergebnis würde die Beobachtungen in den oben genannten Studien bestätigen.

5.1.5 Die Immunglobuline A, M und G

Die Untersuchung von IgA und IgM wurde aufgrund eingeschränkter finanzieller Möglichkeiten nur begrenzt durchgeführt.

Bereits in einer 1990 durchgeführten Studie zur Wirksamkeit einer sublingualen Immuntherapie von Kindern, welche unter einer Milbenallergie litten, konnte gezeigt werden, dass es zu einem Anstieg des IgG- Gesamtspiegels im Serum unter einer solchen Therapie kommt. (Tari MG et al.1990)

Die in dieser Arbeit ermittelte IgG- Bindung auf B- Lymphozyten zeigte bei Patienten unter SLIT im Gegensatz zu Patienten vor Therapie einen deutlichen Anstieg in der nativen Kultur mit statistischer Signifikanz und der mit irrelevantem Allergen (Erle- bzw. Birke) stimulierten Zellkultur. Dies würde die erwähnten Ergebnisse von Tari et al unterstützen. Jedoch zeigte sich beim Vergleich der mit Milbenallergenen stimulierten Proben ein Abfall des IgG bei Patienten nach Therapie. Bei diesem Ergebnis ist zu bedenken, dass die beiden Milbenallergikergruppen unverbundene Stichproben waren. Rogala et al und auch Norris et al (mittels Tierversuchsmodell) konnten in ihren Untersuchungen zwar ein Anstieg des spezifischen IgG ermitteln, jedoch fand hier keine Einflussnahme durch Allergene auf die zu untersuchenden Zellkulturen statt. (Norris CR et al. 2003, Rogala B et al. 2004)

Bahceciler et al zeigten in ihre Studie, dass es bei Milbenallergikern unter SLIT zu einer Verminderung des Medikamentenbedarfs und einer Besserung der Lungenfunktion kam, sich jedoch keine Veränderungen bezüglich des IgG 1 oder IgG 4- Spiegels einstellte. (Bahceciler NN et al. 2005)

Um eine Aussage bezüglich der möglichen Relevanz der Ergebnisse für Verlaufskontrollen unter einer SLIT zu treffen, müssen die Ergebnisse der gesunden Kontrollen mit einbezogen werden.

5.2. Oberflächenmoleküle und membrangebundene Immunglobuline auf B- und T- Zellen gesunder Probanden

5.2.1 Der Transferrin- Rezeptor CD71

Beim Vergleich der CD71 Expression durch T- Zellen, ließ sich für die gesunden Probanden feststellen, dass sie unter Milbenallergenstimulation weniger CD71 produzieren als Milbenallergiker vor Therapie und ähnliche Mengen CD71 exprimieren wie Milbenallergiker unter Therapie. Gesunde produzierten weniger CD71 in der nativen Kultur als Patienten vor und unter SLIT. Relativ vergleichbare Spiegel von CD71 konnte bei den Birkenallergenproben gemessen werden. Die Bildung von CD71 durch B- Zellen lieferte für die Milbenallergenprobe in allen drei Untersuchungsgruppen ähnliche Mengen CD71. Auch die Birkenallergenproben zeigten nur geringe Schwankungen beim Vergleich aller drei Gruppen. Patienten unter Therapie und Gesunde produzierten in den nativen Kulturen mehr CD71 wie Milbenallergiker vor Therapie. Zu beachten ist allerdings, dass bei den gesunden Probanden eine generell höhere Standardabweichung zu ermitteln war als bei den beiden Allergikergruppen. Als mögliches Verlaufskriterium für eine SLIT könnte möglicherweise die Expression von CD71 durch T- Zellen in Betracht kommen, da Milbenallergiker in dieser Arbeit doppelt so viel CD71 produzierten als dies bei Gesunden bzw. Allergikern unter Therapie der Fall war. Viksman et al konnten zeigen, dass es durch Alveolarmakrophagen von Allergikern, welche an Asthma oder allergischer Rhinitis leiden, gegenüber Gesunden zu einer vermehrten CD71 Produktion kam. (Viksman MY et al.1997)

5.2.2 Das Aktivierungsmolekül CD69

Segura et al zeigten in ihrer Studie der Ultra- rush- Immuntherapie bei Wespengiftallergikern für die Expression von CD69 durch T- Zellen, dass es keinen Unterschied in der Expression zwischen Allergikern und Gesunden gibt. (Segura JA et al. 1998) Huang et al hingegen beobachteten, dass Allergiker vor und unter Therapie mehr CD69 bilden als Gesunde. (Huang JL et al. 2002)

Bei Betrachtung der eigenen Ergebnisse bezüglich der CD69 Expression durch T- und B- Zellen konnten bei gesunden Probanden insgesamt höhere CD69 Spiegel gemessen werden als bei Patienten vor und unter SLIT. Gesunde zeigten jedoch einen Abfall der Expression unter Allergenstimulation.

Betrachtet man die Ergebnisse innerhalb der beiden Allergikergruppen, so zeigt der Abfall der CD69 bei Patienten unter Therapie, dass dies möglicherweise eine Option zur Therapieverlaufskontrolle darstellt, der Bezug zu den Gesunden das Ganze jedoch wieder relativiert.

5.2.3 Der Molekülkomplex CD40/ CD154 (CD40 Ligand)

Verschiedene Studien konnten zeigen, dass es bei gesunden Probanden beim Erstkontakt mit einem Allergen zu einer Differenzierung der naiven TH0- Zellen in Richtung TH1- Zellen mit der Produktion vor allem von IFN- gamma und IL- 2 kommt.

(Wierenga EA et al. 1990, Parronchi P et al. 1991)

Die höhere Produktion von IFN- gamma bei Gesunden, könnte den in dieser Arbeit höher gemessenen Spiegel von CD40 bei Gesunden im Vergleich zu Milbenallergikern vor Therapie erklären. Zudem ließe sich so auch die nahezu vergleichbare exprimierte Menge von CD40 bei Milbenallergikern unter Therapie sowie den gesunden Probanden begründen.

Die erhobenen Messdaten für die Expression von CD154 zeigten in dieser Arbeit interessante Ergebnisse. Konnte für die Expression von CD154 bei Milbenallergikern vor Therapie ein höherer mittlerer Spiegel unter Milbenallergenstimulation und deutliche Unterschiede zwischen den eingesetzten Allergenen gezeigt werden, war dies bei Patienten unter Therapie nicht nachweisbar. Die gesunde Kontrollgruppe zeigte unter Allergenstimulation ein etwas anderes Bild. Es konnte hier für die stimulierten Proben eine Mehrproduktion von CD154 festgestellt werden, welche noch über dem Spiegel in der Milbenallergenprobe der Allergiker vor SLIT lag. Für den Vergleich der nativen Proben konnte jedoch eine geringere Bildung von CD154 bei Gesunden als bei Milbenallergikern vor und nach SLIT erkannt werden.

Eine mögliche Erklärung dafür wäre die oben erwähnte eventuelle Mehrproduktion von CD40 über IFN- gamma bei Gesunden und das Zusammenspiel des CD40/

CD40L (CD154) Systems. In einer Studie konnte gezeigt werden, dass es bei gesunden Probanden unter Stimulation, unter anderem mit Ionomycin, zu einer Zunahme der CD154 positiven T- Zellen kam, wenngleich sie bei Allergikern eine höhere Zunahme des CD154 auslöste. (Markert UR et al. 1999)

Die Frage ist nun, ob es Allergenen generell möglich ist bei Gesunden eine derartige Immunreaktion auszulösen, ohne eine allergische Komponente zu beinhalten. Zudem wirft dies die Frage auf, was ein Allergen zu einem Allergen macht. Die Gründe und Mechanismen sind weitgehend unbekannt. Das Zusammenspiel von dendritischen Zellen, B- und T- Zellen und ihrer Produkte ist dabei wichtig. Inwieweit und ob ein mögliches Allergen dies induzieren kann ist unklar. Die Möglichkeit von Proteinen die CD154 Expression bei Gesunden zu beeinflussen oder zu induzieren könnte ihr Potenzial als Allergen erklären.

Es ist zudem zu bedenken ob, die größere Standardabweichung diese Ergebnisse bei gesunden Probanden relativiert. Es müssen weitere Studien untersuchen, ob auch Stoffe die in der Regel nicht zu Allergenen zählen eine ähnliche Reaktion auszulösen vermögen.

5.2.4 Das Zelladhäsionsmolekül CD54

Ihan et al konnten in ihrer Studie zeigen, dass zytotoxische T- Zellen von Gesunden mehr CD54 produzieren als Allergiker. (Ihan A et al. 1997)

Gilain et al hingegen beobachteten, dass bei gesunden Probanden niedrigere CD54 Spiegel zu verzeichnen waren als bei Allergikern. (Gilain L et al. 2000)

In dieser Arbeit zeigten sich bezüglich der CD54 Expression bei gesunden Probanden unter Allergenstimulation höhere mittlere Spiegel als bei Allergikern vor und unter Therapie. Jedoch sind zwischen denen mit verschiedenen Allergenen stimulierten Kulturen nur geringe Schwankungen zu verzeichnen gewesen. Auch in der nativen Kultur bildeten Gesunde mehr CD54.

Bei Betrachtung der Studienlage und der in dieser Arbeit gewonnen Daten, kann CD54 durchaus eine interessante Option zur Therapieverlaufkontrolle bei Allergikern vor und unter einer SLIT sein.

5.2.5 Die Immunglobuline A, M und G

Eine Studie von Mandic et al konnte zeigen, dass es bei Kindern mit allergischem Asthma eine stärkere Expression von IgG als bei Gesunden gibt. (Mandic Z et al. 2004)

Die Messungen in dieser Arbeit zeigten ähnliche Resultate für die Expression von IgG. So zeigten Gesunde niedrigere IgG- Spiegel als Allergiker vor Therapie und eine deutliche niedrigere Expression gegenüber Patienten nach SLIT.

Die meisten Studien bezüglich des IgG beschäftigten sich mit der Veränderung des spezifischen IgE und des IgG 4. In einer an Graspollenallergikern durchgeführten Arbeit konnten Fanta et al bei den sublingual therapierten Patienten einen Anstieg des spezifischen IgE und IgG4 sowie eine verminderte in vitro Proliferation der Lymphozyten bei Stimulation mit Gräserallergenen nachweisen. (Fanta C et al. 1999)

Bousquet et al zeigten ebenfalls, dass die SLIT bei Milbenallergikern mit Asthma zu einem Anstieg des spezifischen IgE und des IgG4 geführt hat. (Bousquet J et al. 1999)

Andere Studien zeigten, dass es nur bei den aktiv behandelten Allergikern zu einer Erhöhung des spezifischen IgE kam, während es beim IgG4 keine signifikante Änderung zu den Ausgangswerten gab. (Guez S et al. 2000)

Bei Purello et al war zwischen der SLIT und Plazebogruppe im Hinblick auf das spezifische IgE und IgG4 kein Unterschied festzustellen, obgleich es zu einem Anstieg des spezifischen IgE in beiden Gruppen kam. Der Symptom- und Medikamentenscore konnte durch die erfolgreiche sublinguale Immuntherapie vermindert werden. (Purello D et al. 1999)

Vor dem Hintergrund der in dieser Arbeit erhobenen Daten ist dem Gesamt- IgG- Spiegel und dessen Verlauf unter Therapie dennoch eine Bedeutung beizumessen.

5.3 Klinik der SLIT

Bei allen in dieser Arbeit untersuchten Milbenallergikern konnte unter sublingualer Immuntherapie eine Verbesserung der klinischen Symptomatik festgestellt werden, was die Wirkung einer solchen Therapie unterstreicht.

In der von Andre et al durchgeführten Metaanalyse von insgesamt 8 europäischen Studien zur SLIT zeigte sich, dass unter der Therapie kleinere Nebenwirkungen, wie Juckreiz im Mund, häufiger waren. Allerdings unterblieben schwerwiegende

unerwünschte Effekte oder lebensbedrohliche Zustände bei der Einhaltung des Therapieregimes. (Andre C et al. 2000)

Das verminderte Auftreten von unangenehmen Begleiterscheinungen ist neben der bequemen Art und Weise der Applikation einer der wesentlichen Vorteile der sublingualen Immuntherapie. Durch die selbständige Medikamenteneinnahme und die damit verbundene Reduktion der Arztkonsultationen vergrößert sich zudem die Freiheit des Patienten. (Passalacqua G et al. 1999)

Trotz sehr guter Ergebnisse sind noch nicht alle Fragenstellungen zur Wirksamkeit der SLIT geklärt. Es bestehen immer noch Unklarheiten über optimale Darreichungsform (Tropfen, Tabletten oder Ähnliches), Erhaltungsdosis und Aufbaudosis, Verabreichungsfrequenz, Therapiedauer und Langzeitwirkungen. (Markert UR, Elsner P: Local Immunotherapy in Allergy. Basel, Karger, 2003, vol 82, pp 127-135)

Die vorliegende Arbeit konnte demonstrieren, dass Lymphozyten von Allergikern anders auf Allergenstimulation reagieren als von Gesunden, und dass sich unter einer SLIT Änderungen ergeben. Es ist zu vermuten, dass diese veränderten immunologischen Reaktionen mit der klinischen Wirkung der SLIT zusammen hängen.

Die sublinguale Immuntherapie stellt damit eine mögliche Alternative zur subkutanen Immuntherapie dar. Weitere Studien sind jedoch nötig, um den Wirkmechanismus aufzuklären und die optimalen Applikations- Schemata zu definieren.

ZUSAMMENFASSUNG

Hintergrund: Für Patienten, insbesondere Kinder, welche an einer allergischen Rhinitis leiden, stellt die sublinguale Immuntherapie eine effektive Methode zur Senkung klinischer Symptome und immunologisch vermittelter lokaler Entzündungsprozesse dar. Die Wirksamkeit einer solchen sublingualen Immuntherapie ist durch Doppelblindstudien und Metaanalysen untersucht und durch die Weltgesundheitsorganisation validiert worden. Dennoch ist man weiterhin darauf bedacht den Wirkmechanismus einer solchen Therapie zu erforschen und mögliche Parameter zu finden, welche zur Verlaufskontrolle dieser Behandlungsform herangezogen werden können.

Ziele: In dieser Arbeit wurden Milbenallergiker vor (n= 24) und während (n= 12) einer sublingualen Immuntherapie sowie gesunde Probanden (n= 15) auf mögliche Veränderungen bezüglich der Expression verschiedener zellulärer Oberflächenmoleküle und membrangebundener Immunglobuline durch T- und B- Zellen unter Allergenstimulation in vitro untersucht.

In einer anderen Patientengruppe wurden Wespengiftallergiker vor (n= 8) und nach (n= 8) einer Ultra- Rush- Therapie mit Hilfe von Elispottests auf mögliche Veränderungen in der Zytokinproduktion durch Lymphozyten unter Allergenstimulation im Vergleich zu gesunden Kontrollen in vitro untersucht.

Es sollte außerdem untersucht werden, ob unterschiedliche Allergene an Lymphozyten gesunder Probanden gleichartige Effekte hervorrufen können.

Material und Methoden: Die für die Untersuchungen benötigten Lymphozyten wurden mittels eines Dichtegradienten gewonnen. Die Lymphozyten der Milbenallergiker und die gesunden Kontrollen in dieser Untersuchungsgruppe wurden nach 72 stündiger Allergenstimulation (Milben,- Erlen- bzw. Birkenallergen/ bei gesunden zusätzlich noch Katzenallergen) mit den Antikörpern folgender Oberflächenmoleküle versetzt: CD3 (T- Zellrezeptor), CD20 (B- Zellrezeptor), CD71 (Transferrin- Rezeptor), CD69 (allgemeiner Aktivierungsfaktor), CD54 (ICAM- 1, interzelluläres Adhensionsmolekül) sowie CD154 und CD40 (Ligandensystem, T- und B- Zell- kontakte). Zusätzlich wurden die zellgebundenen Immunglobuline A, M und G untersucht. Die Messung dieser Oberflächenmoleküle erfolgte mittels Durchflusszytometrie (FACS). Die Beurteilung der Zytokinprofile (IL- 4, IL- 10, IL-13 und IFN- gamma) erfolgte mit Hilfe eines Immunassays (Elispot).

Ergebnisse: Die FACS- Auswertung zeigte unter Milbenallergenstimulation signifikant höhere mittlere Expressionen von CD71 durch B- Zellen und CD54 durch T- Zellen bei Patienten vor einer SLIT im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle und der mit irrelevantem Allergen (Erle- bzw. Birkenallergen) stimulierten Zellkultur. Patienten unter SLIT zeigten weniger Schwankungen der mittleren Expression von CD71, CD69, CD40, CD54 und CD154 beim Vergleich der verschieden stimulierten Kulturen. Es konnte hierbei festgestellt werden, dass Milbenallergiker unter SLIT tendenziell mehr IgG produzieren.

Die Betrachtung der gesunden Kontrollen lieferte interessante Ergebnisse bezüglich der CD154 Expression. Es zeigte sich eine signifikant höhere Produktion dieses Oberflächenmoleküls unter Allergenstimulation als in nativer Zellkultur. Zudem zeigten sich höhere mittlere Expressionswerte des CD154 als bei Milbenallergikern vor oder unter Therapie.

Bei den Wespengiftallergikern zeigte sich bezüglich des IFN- gamma und IL- 10 eine Expressionsteigerung unter subkutaner Immuntherapie.

Schlussfolgerungen: Diese Daten zeigen, dass es Unterschiede in der Reaktion von Lymphozyten auf Allergenstimulation bei Patienten vor und während einer SLIT gibt. Da bei denselben Patienten auch eine Verbesserung der Symptomatik beobachtet wurde, kann gefolgert werden, dass immunologische Veränderungen und klinische Besserung ursächlich zusammenhängen können. Dies müsste durch weitere prospektive Studien geklärt werden.

Die Arbeit gibt außerdem Hinweise darauf, dass verschiedene Allergene die gemeinsame Fähigkeit besitzen, in Zellen von gesunden Probanden, gleiche Effekte zu induzieren (Induktion von CD154 auf T- Zellen). Diese Fähigkeit könnte entscheidend sein für die Auslösung einer allergischen Sensibilisierung gegen das entsprechende Antigen. Es wäre auch denkbar, dass einige Schadstoffe solche Effekte unterstützen und somit zur Allergisierung beitragen.

QUELLENVERZEICHNIS

- Abramson M, Puy R, Weiner J.1999. Immunotherapy in asthma: an updated systematic review. *Allergy*, 54:1022-1041.
- Abramson MJ, Puy RM, Weiner JM.2000. Allergen immunotherapy for asthma. *Cochrane Database Syst Rev*, 2.
- Adelroth E, Rak S, Haahtela T, Aasand G, Rosenhall L, Zetterstrom O, Byrne A, Champain K, Thirwell J, Cioppa GD, Sandstrom T.2000. Recombinant humanized mAb- E25, an anti- IgE mAb, in birch pollen- induced seasonal allergic rhinitis. *J Allergy Clin Immunol*,106: 253-9.
- Akoum H, Tsicopoulos A, Vorng H, Wallaert B, Dessaint JP, Joseph M, Hamid Q, Tonnel AB.1996. Venom immunotherapy modulates interleukin-4 and interferon-g messenger RNA expression of peripheral T lymphocytes. *Immunology*,87:593-598.
- Atsuta J, Sterbinsky SA, Plitt J, Schwiebert LM, Bochner BS, Schleimer RP.1997. Phenotyping and cytokine regulation of the BEAS- 2B human bronchial epithelial cell: demonstration of inducible expression of the adhesion molecules VCAM- 1 and ICAM- 1. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 5 (Vol 17), 571-582.
- Bachert C.2002.Die Bedeutung von Histamin als Entzündungsmediator bei allergischen Erkrankungen.*Allergologie*,2:74-80.
- Bachert C.2002.The role of histamin in allergic disease. Reappraisal of it's inflammatory potential. *Allergy*, 57: 287-296.
- Bahceciler NN, Arikan C, Taylor A, Akdis M, Blaser K, Barlan IB, Akdis CA.2005. Impact of sublingual immunotherapy on specific antibody levels in asthmatic children allergic to house dust mites. *Int Arch Allergy Immunol*, 136 (3): 287-294.
- Bellinghausen I, Metz G, Enk AH, Christmann S, Knop J, Saloga J.1997. Insect venom immunotherapy induces interleukin-10 production and a T helper 2 -to- T helper1 shift, and changes surface marker expression in venom-allergic subjects. *Eur J Immunol*, 27: 1131-9.
- Bentley Am,Hamid Q,Robinson DS,Schotmann E,Meng Q,Assoufi B,Kay AB,Durham SR.1996.Prednisolone treatment in asthma.Reduction in numbers of eosinophiles ,T cells ,tryptase – only positive mast cells and modulation of IL -4,IL -5 ,and interferon –gamma cytokine gene expression within the bronchial mucosa .*Am J Respir Crit Care Med*,153:551-556.
- Bjorksten B,Dumitrascu D,Foucard T,Khetsuriani N,Khaitov R,Leja M,Lis G,Pekkanen J,Priftanji A,Riikjarv MA.1998.Prevalence of childhood asthma,rhinitis and eczema in Scandinavia and Eastern Europe.*Eur Respir J*,12:S432-437.
- Blainey AD,Phillips MJ,Ollier RJ,Davies RJ.1984.Hyposensitization with atyrosin adsorbed extract of *Dermatophagoides pteronyssinus* in adults with perennial rhinitis.*Allergy*,39:521-528.
- Blair H, Herbert RL.1973.Treatment of seasonal allergic rhinitis with 2 percent sodium cromoglycate solution. *Clin Allergy*, 3:283-288.
- Bonsmann U,Bachert C,Delank KW,Rhodewald P.2001.Presence of fluticasone propionate on human nasal mucosal surface and in human nasal tissue over a period of 24h after intranasal application. *Allergy*, 56:532-5.
- Bosquet J,van Cauwenberge P,Khaltaev N.2001.ARIA Workshop Group.World Health Organisation.Allergic rhinitis and it's impact on asthma(ARIA).*J Allergy Clin Immunol*,108:S147-334.

Bottari V, Frezzolini A, Ruffelli M, Puddu P, Fontana L, DE Pita O. 1999. Cyclosporin A reduces sCD30 serum levels in atopic dermatitis. a new possible immune intervention. *Allergy*, 54: 507-510.

Bousquet J, Becker WM, Hejjaoui A, Chanal I, Lebel B, Dhivert H, Michel FB. 1991. Differences in clinical and immunologic reactivity of patients allergic to grass pollens and to multiple-pollen species. II. Efficacy of a double-blind, placebo-controlled, specific immunotherapy with standardized extracts. *J Allergy Clin Immunol*, 88: 43-53.

Bousquet J, Chanal I, Alquie MC, Charpin D, Didier A, Germontry J, Greillier P, Ickovic MH, Maria Y, Montdue F, Perrin – Fayolle M, Seignalet C, Severac JC, Verguenegre A, Aubert B, Bous J. 1993. Prevention of pollen rhinitis symptoms. Comparison of fluticasone propionate aqueous nasal spray and disodium cromoglycate aqueous nasal spray. A multicenter, double-blind, double dummy, parallel group study. *Allergy*, 48: 327– 333.

Bousquet J, Maasch HJ, Hejjaoui A, Skassa Brociek W, Wahl R, Dhivert Hea. 1989. Double-blind, placebo-controlled immunotherapy with mixed grass-pollen allergoids. III. Efficacy and safety of unfractionated and high-molecular-weight preparations in rhinoconjunctivitis and asthma. *J Allergy Clin Immunol*, 84: 546-556.

Bousquet J, Scheinmann P, Guinépain MT, Perrin Fayolle M, Sauvaget J, Tonnel AB, Pauli G, Caillaud D, Dubost R, Leynadier F, Vervloet D, Herman D, Galvain S, Andre C. 1999. Sublingual-swallow immunotherapy (SLIT) in patients with asthma due to house-dust mites: a double-blind, placebo-controlled study. *Allergy*, 54: 249-260.

Bousquet J, Van Cauwenberge P, Bachert C, Canonica GW, Demoly P, Durham SR, Fokkens W, Lockey R, Meltzer EO, Mullol J, Naclerio RM, Price D, Simons FE, Vignola AM, Warner JO. 2003. Requirements for medications commonly used in the treatment of allergic rhinitis. *Allergy*, 58: 192 – 197.

Bousquet J, Bullinger M, Fayol C, Marquis P, Valentin B, Burtin B. 1994. Assessment of quality of life in patients with perennial allergic rhinitis with the french version of the SF-36 Health Status Questionnaire. *J Allergy Clin Immunol*, 94: 182-188.

Bousquet J, Lockey RF, Malling HJ. 1998. Allergen immunotherapy. therapeutic vaccines for allergic diseases. WHO Position paper. *Allergy*, 53 Suppl 44: 1-42.

Bousquet J, Maasch HJ, Martinot B et al. 1988. Double blind, placebo-controlled immunotherapy with mixed grass-pollen allergoids. II. Comparison between parameters assessing the efficacy of immunotherapy. *J Allergy Clin Immunol*, 82: 439-446 .

Bousquet J, Maasch JH, Hejjaoui A, Skassa Brociek W, Wahl R, Dhivert H, Michel FB. 1989. Double-blind, placebo-controlled immunotherapy with mixed grass-pollen allergoids. III. Efficacy and safety of unfractionated and high- molecular-weight preparations in rhinoconjunctivitis and asthma. *J Allergy Clin Immunol*, 42: 401-413.

Brochard U. 2003. Neue H1- Antihistaminika im Vergleich. *Allergologie*, 26: 24– 32.

Büchner K, Siepe M. 1998. Nutzen der Hyposensibilisierung unter wirtschaftlichen Aspekten. *Allergo J*, 4: 156-163.

Cagnoni F, Oddera S, Giron-Michel J, Riccio AM, Olsson S, Dellacasa P, Melioli G, Canonica GW, Azzarone B. 2004. CD 40 on adult human airway epithelial cells: expression and proinflammatory effects. *J Immunol*, 172 (5): 3205-14.

Casale TB, Bernstein IL, Busse WW, LaForce CF, Tinkelman DG, Stoltz RR, Dockhorn RJ, Reimann J, Su JQ, Fick RB Jr, Adelman DC. 1997. Use of an anti- IgE humanized monoclonal antibody in ragweed- induced allergic rhinitis. *J Allergy Clin Immunol*, 100: 110-21.

Chung KF. 1998. The complementary role of glucocorticosteroids and long-acting beta-adrenergic agonists. *Allergy*, 53 Suppl 42: 7-13.

Cookson WOCM, Sharp PA, Faux JA, Hopkin JM. Linkage between immunoglobulin E responses underlying asthma and rhinitis and chromosome 11q. *Lancet*, i:S1292-1294.

Craig S, Rubenstein E, Reisman RE, Arbesman CE. 1977. Treatment of ragweed hay fever with intranasally administered disodium cromoglycate. *Clin Allergy*, 7:569–576.

Creticos PS, Van Metre TE, Mardiney MR, Rosenberg GL, Morman PS, Adkinson NF Jr. 1984. Dose response of IgE and IgG antibodies during ragweed immunotherapy. *J Allergy Clin Immunol*, 73: 94-104.

Creticos PS. 1996. Effects of nedocromil sodium on inflammation and symptoms in therapeutic studies. *J Allergy Clin Immunol*, 98:143–149.

Daeron M. 1997. Negative regulation of mast cell activation by receptors for IgG. *Int Arch Allergy Immunol*, 113: 138-41.

Dahlen SE. 1998. Lipid mediator pathways in the lung. Leukotrienes as a new target for the treatment of asthma. *Clin Exp Allergy*, 28 Suppl 5:141–146.

Delacourt C. 1999. Corticoides and allergy. *Arch Pediatr*, 6 Suppl.1:105-107.

DGAI und ADA, Hrsg. Weißbuch 2003. Allergie in Deutschland. 2. Auflage München: Urban und Vogel.

Dolen WK. 1996. Asthma as an inflammatory disease. Implications for management. *J Am Board Fam Pract*, 9:182-190.

Dolovich J, Kennedy L, Vickerson F, Kazim F. 1987. Control of the hypersecretion of vasomotor rhinitis by topical ipratropium bromide. *J Allergy Clin Immunol*, 80:274-278.

Donahue JG, Greineder DK, Connor-Lacke L, Canning CF, Platt R. 1999. Utilization and cost of immunotherapy for allergic asthma and rhinitis. *Ann Allergy Asthma Immunol*, 82:339-347.

Dreborg S, Frew A. 1993. Allergen standardization and skin tests. EAACI Position paper. *Allergy*, 48 Suppl 14:89-92.

Durham SR, Till SJ. 1998. Immunologic changes associated with allergen immunotherapy. *J Allergy Clin Immunol*, 102:157-164.

Durham SR, Varney VA, Gaga M, Jacobson MR, Varga EM, Frew AJ, Kay AB. 1999. Grass pollen immunotherapy decreases the number of mast cells in the skin. *Clin Exp Allergy*, 29:1490-1496.

Durham SR, Ying S, Varney VA, Jacobson MR, Sudderick RM, Mackay IS, Kay AB, Hamid QA. 1992. Cytokine messenger RNA expression for IL-3, IL-4, IL-5 and granulocyte/macrophage colony-stimulating factor in the nasal mucosa after local allergen provocation: relationship to tissue eosinophilia. *J Immunol*, 148: 2390-2394.

Ebner C, Siemann U, Bohle B, Willheim M, Wiedermann U, Schenk S, Klotz F, Ebner H, Kraft D, Scheiner O. 1997. Immunological changes during specific immunotherapy of grass pollen allergy: reduced lymphoproliferative responses to allergen and shift from Th2 to TH1 in T- cell clones specific for Phl, a major grass pollen allergen. *Clin Exp Allergy*, 27:1007-15.

Ehnert B, Lau-Schadendorf S, Weber A, Buettner P, Schon C, Wahn U. 1992. Reducing domestic exposure to dust-mite allergen reduces bronchial hyperreactivity in sensitive children with asthma. *J Allergy Clin Immunol*, 90:135-138.

Eichenfield LF. 2002. Safety and efficacy of pimecrolimus (ASM981) cream 1% in the treatment of mild and moderate atopic dermatitis in children and adolescents. *J Am Acad Dermatol*, 46:495-504.

Fanta C, Bohle B, Hirt W, Siemann U, Horak F, Kraft D, Ebner H, Ebner C. 1999. Systemic immunological changes induced by administration of grass pollen allergens via the oral mucosa during sublingual immunotherapy. *Int Arch Allergy Immunol*, 120: 218-224.

- Fifield R, Libeer JC, Schellekens AP. 1994. Inter-laboratory external quality assessment schemes for specific IgE antibodies. The results of a European scheme for 1992. *Eur J Clin Chem Clin Biochem*, 32:465-472.
- Fisher WG. 1994. Comparison of budesonide and disodium cromoglycate for the treatment of seasonal allergic rhinitis in children. *Ann Allergy*, 73: 515 – 520.
- Fokkens WJ, Godthelp T, Holm AF, Blom H, Klein-Jan A. 1997. Allergic rhinitis and inflammation .The effect of nasal corticosteroid therapy. *Allergy*, 52 Suppl 36:29-32.
- Frederick JM, Warner JO, Jessop WJ, Enander I, Warner JA. 1997. Effect of a bed covering system in children with asthma and house dust –mite hypersensitivity. *Eur Respir J*, 10:361-366.
- Freeman J. 1911. Further observation on the treatment of hay fever by hypodermic inoculations of pollen vaccine. *Lancet*, 2:814-817.
- Furin MJ, Norman PS, Creticos PS, Proud D, Kagey-Sobotka A, Lichtenstein LM, Naclerio RM. 1991. Immunotherapy decreases antigen-induced eosinophil cell migration into the nasal cavity. *J Allergy Clin Immunol*, 88: 27-32.
- Gaga M, Frew AJ, Varney V, Kay AB. 1991. Eosinophil activation and T-lymphocyte infiltration in allergy-induced late skin reactions and delayed-type hypersensitivity. *J Immunol*, 147:816-822.
- Garmendia JV, Zabaleta M, Blanca I, Bianco NE, De Sanctis JB. 2004. Total and biologically active serum- soluble CD 154 in patients with chronic idiopathic urticaria. *Allergy Asthma Proc*, 25 (2): 121-5.
- Gereda JE, Leung DY, Thatayatikom A, Streib JE, Price MR, Kline J, Lin AH. 2000. Relation between house-dust endotoxin exposure, type 1 T cell development, and allergen sensitization in infants at high risk of Asthma. *Lancet*, 355: S1680-1683.
- Gergen PJ, Fowler JA, Maurer KR, Davis WW, Overpeck MD. 1998. The burden of environmental tobacco smoke exposure on the respiratory health of children 2 month through 5 years of age in the united states. Third national and nutrition examination survey 1988 to 1994. *Pediatrics*, 101:E8 .
- Gilain L, Guichard C, Beaujon G, Mom T, Monneyron E, Saleh H, Advenier D, Caillaud D. 2000. Nasal soluble levels of ICAM- 1 in allergic rhinitis. *Ann Otolaryngol Chir Cervicofac*, 117(2): 91-7.
- Golden DB, Kagey-Sobotka A, Valentine MD, Lichtenstein LM. 1981. Dose dependence of Hymenoptera venom immunotherapy. *J Allergy Clin Immunol*, 67:370-374.
- Graft DF. 1996. Allergic and non-allergic rhinitis. Directing medical therapy of specific symptoms. *Postgrad Med*, 100:64-69.
- Guez S, Vatrinet C, Fadel R, Andre C. 2000. House-dust-mite sublingual-swallow immunotherapy (SLIT) in perennial rhinitis: a double-blind, placebo-controlled study. *Allergy*, 55: 369-375.
- Hamilton RG, Kagey-Sobotta A. 2000. In –vitro diagnostic tests of IgE –mediated diseases. *Clin Allergy Immunol*, 15:89-110.
- Hartnell A, Robinson DS, Kay AB, Wardlaw AJ. 1993. CD 69 is expressed by human eosinophils activated in vivo in asthma and in vitro by cytokines. *Immunology*, 80 (2):281-6.
- Haugaard L, Dahl R, Jacobson L. 1993. A controlled dose-response study of immunotherapy with standardized, partially purified extract of house dust mite. clinical efficacy and side effects. *J Allergy Clin Immunol*, 91:709-722.
- Haugaard L, Dahl R. 1992. Immunotherapy in patients allergic to cat and dog dander. I. Clinical results. *Allergy*, 47:249-254.

Heino M.1994.Regularly inhaled beta-agonists with steroids are not harmful in stabile asthma. J Allergy Clin Immunol,93:80–84.

Hepner MJ,Ownby DR,Anderson JA,Rowe MS,Sears-Ewald D,Brown EB.1990.Risk of systemic reactions in patients taking beta-blocker drugs receiving allergen immunotherapy injections.J Allergy Clin Immunol,86:407-411.

Herz U, Joachim R, Ahrens B, Scheffold A, Radbruch A, Renz H.2001. Allergic sensitization and allergen exposure during pregnancy favor for the development of atopy in the neonate.Int Arch Allergy Immunol,124 (1-3):193-196.

Holopainen E, Backman A, Salo OP.1971.Effect of disodium cromoglycate on seasonal allergic rhinitis. Lancet,1:55 – 57.

Hoshino M,Nakamura Y,Sim JJ,Yamashiro Y,Uchida K,Hosaka K,Isogai S.1998.Inhaled corticosteroid reduced lamina reticularis of the basement membrane b modulation of insuline-like growth factor(IGF)I expression in bronchial asthma.Clin Exp Allergy,28:568-577.

Huang JL, Ou LS, Tsao CH, Chen LC, Kuo ML.2002.Reduced expression of CD 69 and adhesion molecules of T lymphocytes in asthmatic children receiving immunotherapy. Pediatr Allergy Immunol,13 (6):426-33.

Ihan A, Podboj J, Suskovic S, Cor A, Majcen M, Matos E, Gale N, Wraber B.1997.Flow cytometric analysis of lymphocytes isolated from nasal polyps. Folia Biol (Praha), 43(1):15-8.

Illi S, von Mutis E,Lau S,Bergmann R,Niggemann B,Sommerfeld C,Wahn U.2001.Early Childhood infections diseases and the development of asthma up to school age:a birth cohort study. Bmj ,322:S390-395.

Interdisziplinäre Arbeitsgruppe allergische Rhinitis der Sektion HNO 1.2003.Allergische Rhinitis.Leitlinie der Deutschen Gesellschaft für Allergologie und klinische Immunologie. Allergo J,12:184.

Ippoliti F, De Santis W, Volterrani A, Lenti L, Canitano N, Lucarelli S, Frediani T.2003.Immunomodulation during sublingual therapy in allergic children. Pediatr Allergy Immunol,14 (3): 216-21.

Issac Steering Committee.1998.Worldwide variations in the prevalence of asthma symptoms:the International Study of Asthma and Allergies in Childhood(ISAAC).Eur Respir J,2:S315-335.

Jacobson L.2001.Preventive aspects of immunotherapy: prevention for children at risk of developing asthma. Ann Allergy Asthma Immunol, 87(Suppl.) 1:43-46.

Janeway CA,Travers P,Walport M,Shlomchik M, 2002 Immunologie .5.Auflage Heidelberg-Berlin:Spektrum,Akademischer Verlag.

Johansson SGO,O'B Houriane J,Bousquet J,Brujinzeel-Koomen C,Dreborg S,Haahtela T,Kowalski ML,Mygind N, Ring J,van Cauwenberge P,van Hage-Hamsten M,Wüthrich B.2001.A revised nomenclature for allergy.An EAACI position statement form the EAACI nomenclature task force.Allergy,56:813-824.

Julius P, Luttmann W, Knoechel B, Kroegel C, Matthys H, Virchow JC Jr.1999.CD 69 surface expression on human lung eosinophils after segmental allergen provocation. Eur Respir J,13:1253-1259.

Juniper EF,Guyatt GH.1991.Development and testing of a new measure of health status for clinical trials in rhinoconjunctivitis.Clin Exp Allergy,21:77-83.

Jutel M, Pichler WJ, Skrbic D, Urwyler A, Dahinden C, Müller UR. 1995. Bee venom immunotherapy results in decrease of IL-4 and IL-5 and increase of IFN- γ secretion in specific allergen-stimulated T-cell cultures. *J Immunol*, 154: 4187-94.

Kaiser HB, Findlay SR, Georgitis JW, Grossman J, Ratner PH, Tinkelman DG, Roszko, Zegarelli E, Wood CC. 1995. Longterm treatment of perennial allergic rhinitis with ipratropium bromide nasal spray 0,06%. *J Allergy Clin Immunol*, 95:1128-1132.

Kayser FH, Bienz KA, Eckert J, Zinkernagel RM, Hrsg. 2001. Medizinische Mikrobiologie. 10. Auflage. Stuttgart: Georg Thieme Verlag.

Kjellman N-IM. 1977. Atopic disease in 7-year old children. Incidence in relation to family history. *Acta Paediatr Scand*, 66:S465-471.

Klein-Tebbe J, Fuchs T, Klimek L et al. 2000. Die spezifische Immuntherapie (Hyposensibilisierung) mit Allergenen. Positionspapier der DGA, inhaltlich abgestimmt mit dem ÄDA. *Allergo J*, 9:317-324.

Klein-Tebbe J, Fuchs T, Klimek L, Kuehr J, Kunkel G, Lepp U, Niggemann B, Rakoski J, Renz H, Saloga J, Simon J. 2003. Spezifische Immuntherapie bei IgE-vermittelten allergischen Atemwegserkrankungen. *Deutsches Ärzteblatt*, 100:334-339.

Klein-Tebbe J, Lepp U, Niggemann B, Saloga J, Vieluf I, Viettis S, Werferl T, Zuberbier T, Jäger L. 2001. In-vitro-Diagnostik bei Nahrungsmittelallergien. Positionspapier der Deutschen Gesellschaft für Allergologie und klinische Immunologie und des Ärzteverbandes deutscher Allergologen. *Allergo J*, 10:333-339.

Klein-Tebbe J. 2003. Immunologisch basierte allergologische Diagnostik in-vitro und ex-vivo. *Allergo J*, 12:198-200.

Kon OM, Kay AB. 1999. Anti-T cell strategies in asthma. *Inflamm Res*, 48:516-523.

Krämer U, Koch T, Ranft U, Ring J, Behrendt H. 2001. Traffic-related air pollution is associated with Atopy in children living in urban areas. *Epidemiology*, 11:S64-70.

Kuehr J, Brauburger J, Zielen S, Schauer U, Kamin W, Berg A von, Leupold W, Bergmann KC, Rolinck-Wernighaus C, Grave M, Hultsch T, Wahn U. 2002. Efficacy of combination treatment with anti-IgE plus specific immunotherapy in polysensitized children and adolescents with seasonal allergic rhinitis. *J Allergy Clin Immunol*, 109:274-80.

Kulig M, Bergmann R, Klettke U, Wahn V, Tacke U, Wahn U and the multicenter Allergy Study Group. 1999. Natural course of sensitization to food and inhalant allergens during the first 6 years of life. *J Allergy Clin Immunol*, 103:S1173-1180.

Kulig M, Luck W, Lau S, Niggemann B, Bergmann R, Klettke U, Guggenmoos-Holzmann I, Wahn U, MAS Group. 1999. Effect of pre- and postnatal tobacco smoke on specific sensitization to food and inhalant allergens during the first three years of life. *Allergy*, 54:S220-228.

Lau S, Illi S, Sommerfeld C, Niggemann B, Bergmann R, von Mutis E, Wahn U and the multicenter Allergy Study Group. 2000. Early exposure to house-dust mite and cat allergens and the development of childhood asthma: a cohort study. *Lancet*, 356:S1392-1397.

Lin SJ, Chang LY, Yan DC, Huang YJ, Lin TJ, Lin TY. 2003. Decreased intercellular adhesion molecule-1 (CD 54) and L-selectin (CD 62) expression on peripheral blood natural killer cells in asthmatic children with acute exacerbation. *Allergy*, 1 (Vol 58): 67-71.

Lowenstein H. 1980. Timothy pollen allergens. *Allergy*, 35:188-191.

Lüderitz-Püchel U, Keller-Stanislawski B, Hausteil D. 2001. Neubewertung des Risikos von Test- und Therapieallergenen. Eine Analyse der UAW-Meldungen von 1991 bis 2000. *Bundesgesundheitsbl-Gesundheitsforsch-Gesundheitsschutz*, 44:709-718.

Lüllmann H und Mohr K 1999. Pharmakologie und Toxikologie. 14. Auflage Stuttgart: Georg Thieme Verlag.

Lumry WR.1999.A review of the preclinical and clinical data of newer intranasal steroids used in the treatment of allergic rhinitis.J Allergy Clin Immunol,104:150-158.

Maggi E, Del Prete GF, Parronchi P, Tiri A, Macchia D, Biswas P, Simonelli C, Ricci M, Romagnani S.1989.Role of T cells, IL-2 and IL-6 in the IL-4-dependent in vitro human IgE synthesis. Immunology,68:300-306.

Malling HJ,Weeke B.Immunotherapy.1993.Position Paper of the Europeane Academy of Allergology and Clinical Immunology(EAACI).Allergy,48 Suppl:9-35.

Malling HJ.2000.Minimising the risk of allergen –specific injection immunotherapy. Drug Saf,23:323-332.

Mandic Z, Marusic M, Boranic M.2004.Low levels of immungolbulin A in children with intrinsic asthma: a possible protection against atopy. Med Hypotheses, 62 (4): 600-4.

Markert UR, Bär C, Niess JH, Vogelsang H, Zwacka G.1999.Elevated CD154 (CD40 ligand) synthesis in T- cells from allergic patients after nonspecific stimulation in vitro. J Investig Allergol Clin Immunol,9(4):248-52.

Markert UR, Elsner P.2003.Local Immunotherapy in Allergy.Basel, Karger, vol 82, pp 127-135.

Marsh DG,Neely JD,Breazeale DR,Ghosh B,Friedhoff LR,Ehrlich-Kautzky E,Schou C,Krishnaswamy G,Beaty TH.1994.Linkage analysis of IL4 and other chromosome 5q31.1 markers and total immunglobuline E concentration.Science,264:S1152-1156.

McHugh SM, Deighton J, Stewart AG, Lachmann PJ, Ewan PW.1995.Bee venom IT induces a shift in cytokine responses from a TH-2 to a TH-1 dominant pattern.comparison of rush and conventional IT. Clin Exp Allergy,25: 828-838.

Meltzer EO, Malmstrom K, Lu S, Prenner BM, Wei LX, Weinstein SF, Wolfe JD, Reiss TF.2000. Conconitant montekulast and loratadina as treatment for seasonal allergic rhinitis. A randomized, placebo – controlled clinical trial. J Allergy Clin Immunol,105:917–922.

Meltzer EO.1997.The pharmacological basis fort he treatment of perennial allergic rhinitis and non-allergic rhinitis with topical corticosteroids.Allergy,52 Suppl 36:33-40.

Möller C, Dreborg S, Ferdousi.2002. Pollen immunotherapy reduces the development of asthma in children with seasonal rhinoconjunctivitis (the PAT-study). J Allergy Clin Immunol,109:251-256.

Mosbech H,Malling HJ,Biering I,Bowadt H,Soborg M,Weeke B,Lowenstein H1986..Immunotherapy with yellow jacket venom.A comparative study including three different extracts,one adsorbed to aluminium hydroxide and two unmodified.Allergy,41:702-709.

Müller U,Helbig A,Berchtold E.1992.Immunotherapy with honeybee venom and yellow jacket venom is different regarding efficacy and safety.J Allergy Clin Immunol,89:529-535.

Müsken H.1995.Katzen und Vorratsmilben.wichtige Indoor-Allergenquellen.Allergo J,4:S449-453.

Mygind N,Laursen,Dahl R.2000.Systemic corticosteroid treatment for seasonal allergic rhinitis.a common , but poorly understood therapy.Allergy,55:11-5.

Niess JH,Bär C,Nuske K,Vogelsang H,Schlenvoigt G,Heusser C,Junker U,Zwacka G,Markert UR.2000.Immunglobulin-Klassen-Switch im CD40-B-Zell-Kultursystem durch die Interleukine IL-4,IL-6,IL-10,IL-11 und IL-13.Allergologie,23:116-121.

Noon L.1911.Prophylactic inoculation against hay fever.Lancet,1:1572-1573.

- Norris CR, Byerly JR, Decile KC, Berghaus RD, Walby WF, Schlegele ES, Hyde DM, Gershwin LJ. 2003. Allergen- specific IgG and IgA in serum and bronchoalveolar lavage fluid in a model of experimental feline asthma. *Vet Immunol Immunopathol*, 96 (3-4):119-27.
- Palma-Carlos AG, Spinola-Santos A, Ferreira MB, Santos MC, Palma-Carlos ML. 2001. Immunotherapy in allergic rhinitis. *Allerg Immunol (Paris)*, 33 (8):323-6.
- Parronchi P, Macchia D, Piccini MP, Biswas P, Simonelli C, Maggi E, Ricci M, Ansari AA, Romagnani S. 1991. Allergen- and bacterial antigen- specific T- cell clones established from atopic donors show a different role of cytokine production. *Proc Natl Acad Sci*, 88:4538-4542.
- Passalacqua G, Venturi S, Zoccali P, Braidò F, Ghiazza P, Mincarini M, Canonica GW. 1999. Oral and sublingual immunotherapy: general aspects and critical considerations. *Wien Med Wochenschr*, 149:433-437.
- Paul K, Klettke U, Wahn U. 1998. The combined influence of immunotherapy and the mite allergen reduction on bronchial hyperresponsiveness in mite-sensitive asthmatic children. *Eur J Pediatr*, 157:109-113.
- Pichler CE, Marquardsen A, Sparholt S, Lowenstein H, Bircher A, Bischof M, Pichler WJ. 1997. Specific immunotherapy with *Dermatophagoides pteronyssinus* and *D. farinae* results in decreased bronchial hyperreactivity. *Allergy*, 52:274-283.
- Pollard SJ, Spector SL, Yancey SW, Cox FM, Emmet A. 1997. Salmeterol versus theophylline in the treatment of asthma. *Ann Allergy Asthma Immunol*, 78:457-464.
- Poryadin GV, Zhuravleva NE, Salmasi JM, Kazimirsky AN, Semenova LY, Polner SA, Chervinskaya TA. 2002. Immunological mechanism of recovery from an acute stage in patients with atopic bronchial asthma. *Russ J Immunol*, 7(3):259-64.
- Purello D, Ambrosio F, Gangemi S, Isola S, La Motta N, Puccinelli P, Parmiani S, Savi E, Ricciardi L. 1999. Sublingual immunotherapy. a double-blind, placebo-controlled trial with *Parietaria judaica* extract standardized in mass units in patients with rhinoconjunctivitis, asthma, or both. *Allergy*, 54: 968-973.
- Rachelewsky G. 1997. Childhood asthma and allergic rhinitis. The role of leukotrienes. *J Pediatr*, 131: 348-355.
- Reich M, Zwacka G, Markert UR. 2003. Nonspecific plasma proteins during sublingual immunotherapy. *Chem Immunol Allergy*, 82: 99-108.
- Rembold H, Oetzel H. 2004. Kontrolle der Hausstaubmilbe durch Wirkstoffe aus dem Samen des Neemölbaums. *Allergo J*, 13:269-273.
- Ring J, Wenning J. Weißbuch Hrsg. 2000. Allergie in Deutschland. München: Urban und Vogel.
- Robinson DS, Hamid Q, Ying S, Tsicopoulos A, Barkans J, Bentley AM, Corrigan C, Durham SR, Kay AB. 1992. Predominant Th2-like bronchoalveolar T-lymphocyte population in atopic asthma. *N Engl J Med*, 326:298-304.
- Roeper AC, Henz BM, Worm M. 2002. Wasp venom rush immunotherapy induces transient downregulation of B- cell surface molecule expression. *Int Arch Allergy Immunol*, 127(3):226-33.
- Rogala B, Jarzab J, Rymarczyk B, Tluczykont B. 2004. Allergen specific- IgG4 in circulating immune complexes in patients with inhalant allergy undergoing specific immunotherapy. *Wiad Lek*, 57(3-4): 123-30.
- Rogers Pr, Croft M. 1999. Peptide dose, affinity, and the time of differentiation can contribute to the Th1/Th2 cytokine balance. *J Immunol*, 163:1205-1213.
- Grzelewska-Rzymowska, Pietrzkowicz M. 2004. Role of intra cellular adhesion molecule- 1 (ICAM- 1) and its soluble form (sICAM) in chronic airway inflammation. *Pol Merkuriusz Lek*, 16(92):179-82.

Romagnani S, Parrouchi P, D'Elios MM, Romagnani P, Annunziato F, Piccini MP, Mawetti R, Sampognano S, Mavilia C, De Carli M, Maggi E, Del Prete GF. 1997. An update on human Th1 and Th2 cells. *Int Arch Allergy Immunol*, 113:153-156.

Roquet A, Dahlen B, Kumlin M, Ihre E, Anstren G, Binks S, Dahlen SE. 1997. Combined antagonism of leukotrienes and histamine produces predominant inhibition of allergen induced early and late phase airway obstruction in asthmatics, *Am J Respir Crit Care Med*, 155:1856–1863.

Ross RN, Nelson HS, Finegold I. 2000. Effectiveness of specific immunotherapy in the treatment of allergic rhinitis: an analysis of randomized, prospective, single- or double- blind, placebo- controlled studies. *Clin Ther*, 22:342-350.

Ross RN, Nelson HS, Finegold I. 1998. Effectiveness of specific immunotherapy in the treatment of hymenoptera venom hypersensitivity: a meta analysis. *Clin Ther* 2000, 22: 351-358/Bousquet J, Lockey RF, Malling H-J: Allergen immunotherapy: Therapeutic vaccines for allergic diseases. WHO position paper. *Allergy*, 53(Suppl.44):1-42.

Ross RN, Nelson HS, Finegold I. 2000. Effectiveness of specific immunotherapy in the treatment of hymenoptera venom hypersensitivity. a meta-analysis. *Clin Ther*, 22:351-358.

Rueff F, Przybilla B, Fuchs T, Gall H, Rakoski J, Stolz W, Vieluf D. 2000. Diagnose und Therapie der Bienen –und Wespengiftallergie –Positionspapier der Deutschen Gesellschaft für Allergologie und klinische Immunologie(DGAI). *Allergo J*, 9:458-472.

Ruhn J, Denburg J, Dolovic J. 1988. Intranasal nedocromil sodium in the treatment of ragweed – allergic rhinitis. *J Allergy Clin Immunol*, 81:570– 574.

Sandford A, Weir T, Pare P. 1996. The genetics of asthma. *Am J Respir Crit Care Med*, 153:S1749-1765.

Satellitensymposium. 2002. Treat and prevent the flare with Protopic-steroid free monotherapy for atopic dermatitis. Im Rahmen des 11. Kongresses der Europäischen Akademie für Dermatologie und Venerologie, Prag 2002. *Allergo J*, 12:71.

Schäfer T, Borowski C, Diepgen TL, Hellermann M, Piechotowski I, Reese I, Roos T, Schmidt S, Sitter H, Werfel T, Gieler U, Mitglieder der Konsensusgruppe des Aktionsbündnisses Allergieprävention Allergie prävention. 2004. Evidenzbasierte und konsentrierte Leitlinie des Aktionsbündnisses Allergieprävention (abap)-Kurzfassung. *Allergo J*, 13:252-260.

Schata M, Jorde W, Richarz-Barthauer U. 1991. Levocabastine nasal spray better sodium cromoglycate and placebo in the topical treatment of seasonal allergic rhinitis. *J Allergy Clin Immunol*, 87:873– 878.

Schoencker I. 2001. *Allergo J*, 10:95-99.

Secrist H, Chelen CJ, Wen Y, Marshall JD, Umetsu DT. 1993. Allergen immunotherapy decreases interleukin 4 production in CD4+ T cells from allergic individuals. *J Exp Med*, 178:2123-30.

Fireman P. 1996. Cytokines and allergic rhinitis. *Allergy Asthma Proc*, 17:175-178.

Segura JA, Assenmacher M, Irsch J, Hunzelmann N, Radbruch A. 1998. Systemic T- cell unresponsiveness during rush bee-venom immunotherapy. *Allergy*, 53(3):233-40.

Sengler C, Nickel R. 2002. Genetik des Asthma und der atopischen Dermatitis. *Allergologie*, 2:S52-65.

Silvestri M, Spallarossa D, Battistini E, Sabatini F, Pecora S, Parmiani S, Rossi GA. 2002. Changes in inflammatory and clinical parameters and in bronchial hyperreactivity asthmatic children sensitized to house dust mites following sublingual immunotherapy. *J Invest Allergol Clin Immunol*, 12(1):52-9.

Skadhange L R, Christensen K, Kyvik KO, Sigsgaard T. 1999. Genetic and environmental influence on asthma: a population-based study of 11688 Danish twin pairs. *Eur Respir J*, 13:8-14.

Soter NA.1990.Urticaria.Current therapy.
J Allergy Clin Immunol,86,1009-1014.

Stanciu LA, Djukanovic R.1998.The role of ICAM- 1 on T- cells in the pathogenesis of asthma. Eur Respir J,11(4):949-57.

Statistisches Bundesamt.Gesundheitsbericht für Deutschland.Spezialbericht Allergien
2000.Stuttgart: Metzler-Poeschel.

Tari MG, Mancino M, Monti G.1990.Efficacy of sublingual immunotherapy in patients with rhinitis and asthma due to house dust mit. A double- blind study. Allergol Immunopathol (Madr),18(5):277- 84.

Toubi E,Blant A,Kessel A,Golan TD.1997.Low –dose cyclosporin A in the treatment of severe chronic idiopathic urticaria.Allergy,52:312-316.

Tryba A,Ahnefeld FW,Barth J.1994.Akuttherapie anaphylaktoider Reaktionen.Allergo J,3:211-224.

Tschopp JM,Sislek D,Schindler C,Leuenberger P,Perruchoud AP,Wuthrich B,Brutsche M,Zellweger JP,Karrer W,Branali O.1998.Current allergic asthma and rhinitis.diagnostic efficiency of three commonly used atopic markers(IgE,skin prick test and phadiatop).results from 8329 randomized adults from the SAPALDIA Study.Swiss study on air pollution and diseases in adults.
Allergy,53:608-613.

Uthoff H, Spenner A, Reckelkamm W, Ahrens B, Wolk G, Hackler R, Hardung F, Schaefer J, Scheffold A, Renz H, Herz U.2003.Critical role of preconceptional immunization for protective and nonpathological specific immunity in murine neonates.J Immunol,171(7):3485-3492.

Van Snick J.1990.Interleukin-6: an overview. Ann Rev Immunol,8:253-278.

Varney VA, Jacobson MR, Sudderick RM, Robinson DS, Irani AM, Schwartz LB, Mackay IS, Kay AB, Durham SR.1992.Immunohistology of the nasal mucosa following allergen- induced rhinitis. Identification of activated T lymphocytes, eosinophils and neutrophils.
Am Rev Respir Dis,145:170-176.

Viksman MY, Liu MC, Bickel CA, Schleimer RP, Bochner BS. Phentypic analysis of alveolar macrophages and monocytes in allergic airway inflammation.1997.I. Evidence for activation of alveolar macrophages, butnot peripheral blood monocytes, in subjects with allergic rhinitis and sathma. Am J Respir Crit Care Med,155(3):858-863.

von Ehrenstein OS,von Mutis E,Illi S,Baumann L,Bohm O,von Kries R.2000.Reduced risk of hay fever and asthma among children of farmers.Clin Exp Allergy,30:S187-193.

von Mutis E,Braun-Fahrlander C,Schierl R,Riedler J,Ehrlermann S,Maisch S,Waser M,Novak D.2000.Exposur to endotoxin or other bacterial components might protect against the development of atopy.Clin Exp Allergy,30:1230-1234.

von Piquet C.Allergie.1906.Munch Med Wschr,53:S1457.

Wahn U,Lau S,Bergmann R,Kulig M,Forster J,Bergmann K,Bauer CP,Guggenmoos-Holzmann I.1997.Indoor allergen exposures-a risk for sensitization during the first three years of life.J Allery Immunol,99:S763-769.

WHO position paper.1998.Allergen Immunotherapy. therapeutic vaccines for allergic diseases.Allergy,53 Suppl 44:6.

WHO/IUS Allergen Nomenclature Subcommittee.1995.Allergen nomenclature.
Clin Exp Allergy,25:27-37.

Wierenga EA, Snoek M, De Groot C, Chretien I, Bos JD, Jansen HM, Kapsenberg ML.1990.Evidence for compartmentalization of functional subsets of CD4+ T lymphocytes in atopic patients. J Immunol,144:4651-4656.

Williams H,Robertson C,Stewart A,Ait-Khaled N,Anabwani G,Anderson R,Asher I,Beasky R,Bjorksten B,Burr M,Clayton T,Crane J,Ellwood P,Keil U,Lai C,Mallol J,Martinez F,Mitchell E,Montefort S,Pearce N,Shah J,Sibbald B,Strachan D,von Mutis E,Weiland S. 1999.Worldwide variations in the prevalence of symptoms of atopic eczema in the International Study of Asthma and Allergies in Childhood.J Allergy Clin Immunol,103:S125-138.

Wilson AM,Orr LC,Sims EJ,Lipworth BJ.2001.Effects of monotherapy with intranasal corticosteroid or combined oral histamine and leukotriene receptor antagonists in seasonal allergic rhinitis.Clin Exp Allergy,31:61-68.

Zuberbier T,Henz BM.1999.Use of cetirizine in dermatologic disorders.
Ann Allergy Asthma Immunol,83:476-480.

Danksagung

Herrn PD Dr. med. habil. Udo R. Markert danke ich für die freundliche Überlassung des Themas und die wissenschaftliche Betreuung.

Für die umfassende Unterstützung bei der Konzipierung, Durchführung und Auswertung der Untersuchungen gilt mein besonderer Dank Herrn Dr. med. U.R. Markert. Außerdem möchte ich mich bei allen Mitarbeitern des Placentalabors und der Poliklinik für Allergologie der Universitätshautklinik Jena und bei allen anderen an dieser Beobachtungsstudie beteiligten Doktoranden bedanken, die in vielfältiger Weise zum Gelingen der Messungen beigetragen haben.

Für die klinische Betreuung der Patienten und die Bereitstellung der Blutproben bedanke ich mich bei Herrn Prof. Dr. med. habil. G. Zwacka (Kinderklinik Apolda).

Bei den Firmen HAL-Allergie GmbH, AID Autoimmundiagnostika GmbH und der Firma Immunotools möchte ich mich für die geleistete Zusammenarbeit und vielseitige Unterstützung bedanken.

Ebenso gilt mein Dank der Deutschen Gesellschaft für Allergologie und klinische Immunologie, die durch Ihre Zuwendung die Präsentation der Ergebnisse dieser Arbeit bei nationalen und internationalen Kongressen ermöglichte.

Ein besonderer Dank gilt meinem Lebensgefährten Ronny Grimm für die Unterstützung und aufgebrachte Geduld während der Erstellung dieser Arbeit, sowie meiner Familie und meinen Freunden.

Ehrenwörtliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass mir die Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät der Friedrich- Schiller- Universität bekannt ist,
ich die Dissertation selbst angefertigt habe und alle von mir benutzten Hilfsmittel,
persönlichen Mitteilungen und Quellen in meiner Arbeit angegeben sind,

mich folgende Personen bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der
Herstellung des Manuskripts unterstützt haben: Herr PD Dr. med. Udo R. Markert
und Herr Dipl. biol. Tobias G Pöhlmann,

die Hilfe eines Promotionsberaters nicht in Anspruch genommen wurde und dass
Dritte weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen von mir für Arbeiten
erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation
stehen,

dass ich die Dissertation noch nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere
wissenschaftliche Prüfung eingereicht habe und

dass ich die gleiche, eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere
Abhandlung nicht bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht habe.

Jena, 20. September 2005

Unterschrift

Lebenslauf

Name	Franziska Debevc
Geburtsdaten	19. Februar 1981, Bad Salzungen
Ausbildung	1987- 1997 II. Staatliche Regelschule Bad Salzungen
	1997 Realschulabschluss
	1997- 2000 Dr. Sulzberger Gymnasium Bad Salzungen
	2000 Abitur
	2000 Studium der Humanmedizin an der Friedrich- Schiller- Universität Jena
	2002 Ärztliche Vorprüfung
	2003 Erster Abschnitt der ärztlichen Prüfung
	2005 Zweiter Abschnitt der ärztlichen Prüfung